

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Jakub Červený

ENZYMOVÁ PŘÍPRAVA A ANALÝZA BIOAKTIVNÍCH
OLIGOSACHARIDŮ

Enzymatic synthesis and analysis of bioactive
oligosaccharides

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. června 2020

Abstrakt

V biochemii jsou enzymy s výhodou využívány pro syntetické reakce. Jejich hlavní výhodou je vysoká substrátová specifita, stereo- a regiosektivita. Jednou skupinou enzymů, účastnících se reakcí se sacharidovými substráty, jsou glykosidasy tj. O-glykosidhydrolasy (EC 3.2.1.). Jejich přirozenou aktivitou je hydrolýza glykosidové vazby, avšak pokud se sníží aktivita vody v reakční směsi, jsou schopny vykazovat i aktivitu syntetickou, tzv. transglykosylaci. Této vlastnosti je využíváno *in vitro* k syntéze di- a oligosacharidů.

V této práci je představena aplikace enzymu β -galaktosidasy z *B. circulans* (BgaC) s regiosektivitou vůči $\beta(1\rightarrow3)$ vazbě. Enzym byl rekombinantně exprimován v *E. coli* jako konstrukt s histidinovou kotvou a purifikován pomocí afinitní chromatografie s Ni^{2+} ionty. *In vitro* je tento enzym schopen selektivně přenášet β -galaktosyl na řadu akceptorů, s nimiž tvoří $\beta(1\rightarrow3)$ regioisomery. Po optimalizaci reakčních podmínek jsme připravili dva bioaktivní disacharidy: Thomsen-Friedenreichův antigen (TF antigen; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc) a *p*-nitrofenyl-glykosid odvozený od *N*-acetylaktosaminu typu I (*p*NP-LacNAc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-*p*NP).

Čistota obou produktů byla potvrzena pomocí HPLC a struktura byla ověřena pomocí NMR spektroskopie. Výtěžek přípravy TF antigenu byl 10 mg (22 %) a u *p*NP-LacNAc 9 mg (15 %). Dále byla analyzována afinita připravených látek ke galektinu-1 (Gal-1) a galektinu-3 (Gal-3) pomocí kompetitivního inhibičního stanovení typu ELISA. U obou připravených ligandů byla zjištěna vyšší afinita ke Gal-3 než ke Gal-1.

Klíčová slova

ELISA; enzymová syntéza; galaktosidasa; galektin; TF antigen

Abstract

In biochemistry, enzymes are often used for catalytic reactions. Their main advantage is a high substrate specificity, stereo- and regioselectivity. Glycosidases - O-glycoside hydrolases (EC 3.2.1) – belong among large group of carbohydrate-active enzymes. Their major activity is hydrolysis but if the water activity in the reaction medium is suppressed, they switch their major activity to synthesis (transglycosylation). This feature is exploited in the *in vitro* synthesis of di- and oligosaccharides.

This thesis describes the application of the β -galactosidase from *B. circulans* (BgaC) selective for the formation of $\beta(1\rightarrow3)$ bond. The enzyme was recombinantly expressed in *E. coli* cells as a His-tagged construct and purified by Ni²⁺ affinity chromatography. *In vitro*, this enzyme is able to selectively transfer β -galactosyl moiety on a range of acceptors, affording exclusively $\beta(1\rightarrow3)$ bound regioisomers. After optimizing the transglycosylation reactions, this enzyme was used to prepare two bioactive disaccharides: Thomsen-Friedenreich antigen (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc) and *p*-nitrophenyl glycoside of *N*-acetyllactosamine type I (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-*p*NP).

Both transglycosylation products were analyzed by HPLC for purity and by NMR for structural analysis. TF antigen was prepared in a yield of 10 mg (22 %) and *p*NP-LacNAc in a yield of 9 mg (15 %). I further analyzed the affinity of prepared compounds for galectins -1 and -3 by competitive ELISA-type assay and I found that both prepared ligands showed higher selectivity to human recombinant galectin-3 than to galectin-1.

Keywords

Enzymatic synthesis; ELISA; Galactosidase; Galectin; TF antigen

Poděkování

Především bych chtěl poděkovat vedoucí své bakalářské práce doktorce Pavle Bojarové za odborné vedení, konzultaci a trpělivost při práci v laboratoři a následném zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat panu profesoru Vladimírovi Křenovi, že mi umožnil práci v Laboratoři biotransformací, paní doktorce Lucii Petráskové za pomoc při HPLC analýze připravených vzorků, doktorce Heleně Pelantové za NMR analýzu a všem ostatním kolegům za trpělivost a veškerou pomoc.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 8 -
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	- 10 -
1.1. GLYKOSIDASY.....	- 10 -
1.1.1. Charakterizace a klasifikace glykosidas.....	- 10 -
1.1.2. Mechanismus reakce katalyzované glykosidasami.....	- 11 -
1.1.3. β -Galaktosidasy.....	- 12 -
1.2. GALEKTINY.....	- 14 -
1.2.1. Klasifikace a charakteristika.....	- 14 -
1.2.2. Funkce galektinů <i>in vivo</i>	- 15 -
1.2.3. Galektin-1.....	- 16 -
1.2.4. Galektin-3.....	- 17 -
1.3. VYBRANÉ SACHARIDOVÉ LIGANDY GALEKTINŮ.....	- 18 -
1.3.1. Thomsen-Friendenreichův antigen.....	- 19 -
1.3.2. <i>N</i> -Acetyllaktosamin.....	- 19 -
1.3.3. <i>N,N'</i> -Diacetyllaktosamin.....	- 20 -
1.4. METODY STANOVENÍ INTERAKCE GALEKTINŮ.....	- 20 -
1.4.1. ELISA.....	- 20 -
1.4.2. Povrchová plasmonová rezonance.....	- 24 -
1.4.3. Izotermální titrační kalorimetrie.....	- 26 -
2. CÍL PRÁCE.....	- 28 -
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 29 -
3.1. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	- 29 -
3.2. SEZNAM ROZTOKŮ A MÉDIÍ.....	- 30 -
3.3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	- 32 -
3.4. PRODUKCE β -GALAKTOSIDASY.....	- 33 -
3.4.1. Transformace plasmidu do <i>E. coli</i>	- 33 -
3.4.2. Kultivace <i>E. coli</i>	- 33 -
3.4.3. Zpracování biomasy.....	- 34 -
3.4.4. Purifikace β -galaktosidasy afinitní chromatografií.....	- 34 -
3.5. CHARAKTERIZACE β -GALAKTOSIDASY.....	- 35 -
3.5.1. Stanovení čistoty a koncentrace β -galaktosidasy.....	- 35 -
3.5.2. Stanovení aktivity β -galaktosidasy.....	- 36 -
3.5.3. Stanovení kinetických parametrů β -galaktosidasy.....	- 38 -
3.6. ENZYMOVÁ SYNTÉZA SACHARIDŮ.....	- 39 -
3.6.1. Metody analýzy sacharidů a průběhu jejich syntézy.....	- 39 -
3.6.2. Příprava TF antigenu.....	- 41 -
3.6.3. Příprava disacharidu <i>p</i> NP-LacNAc typ 1.....	- 42 -
3.7. STANOVENÍ AFINITY DISACHARIDŮ POMOCÍ KOMPETITIVNÍ METODY ELISA.....	- 43 -
4. VÝSLEDKY.....	- 45 -

4.1.	PRODUKCE A PURIFIKACE β -GALAKTOSIDASY V <i>E. COLI</i>	- 45 -
4.2.	BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE β -GALAKTOSIDASY	- 46 -
4.3.	TRANSGLYKOSYLAČNÍ REAKCE	- 48 -
4.3.1.	Příprava TF antigenu	- 48 -
4.3.2.	Příprava disacharidu <i>p</i> NP-LacNAc typ 1.....	- 50 -
4.4.	VAZEBNÁ AFINITA PŘIPRAVENÝCH LIGANDŮ KE GAL-1 A GAL-3	- 52 -
5.	DISKUZE	- 55 -
6.	ZÁVĚR	- 58 -
7.	ZDROJE.....	- 59 -

PŘÍLOHA 1

PŘÍLOHA 2

Seznam použitých zkratek

- A_{420} , absorbance roztoku při 420 nm
- AK, aminokyselina
- ASF, asialofetuin
- Bcl-2, *B-cell lymphoma 2*
- CAZy, *Carbohydrate Active Enzymes*
- CD45, tyrosinfosfatasa
- CRD, doména rozpoznávající sacharid (angl. „*Carbohydrate Recognition Domain*“)
- dH₂O, deionizovaná voda
- DTT, dithiotreitol
- EC₅₀, polovina maximální efektivní koncentrace
- ED₅₀, dávka referenční látky, která vyvolá specifický efekt u 50 % populace
- EPBS, PBS pufr s příměsí 2mmol l⁻¹ EDTA
- Gal-1; Gal-3, galektin-1; -3
- histidinová kotva, tj. sekvence po sobě jdoucích (nejčastěji šesti) histidinových zbytků připojených na N- nebo C-konec proteinu.
- HPLC, vysokoučinná kapalinová chromatografie
- IC₅₀, polovina maximální inhibiční koncentrace
- IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
- LDN; LacdiNAc, *N, N'*-diacetyllaktosamin (β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc)
- LacNAc, *N*-acetyllaktosamin (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc)
- LB, medium Luria-Bertani
- LMW, marker pro SDS elektroforézu (angl. „*low molecular weight*“)
- mRNA, mediátorová ribonukleová kyselina
- NK, přirozené zabíječské buňky (angl. „*natural killer cells*“)
- ot./min, otáčky za minutu
- PBS, Fosfátový pufr

- PMSF, fenylmethanolsulfonylfluorid
- *p*NP-Gal, *p*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid
- *p*NP-GlcNAc, *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid
- SDS-PAGE, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
- SP1, proximální specifický protein 1
- TLC, chromatografie na tenké vrstvě
- TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, chromogenní substrát pro stanovení ELISA
- TEMED, tetramethylethylendiamin

1. Teoretická část

1.1. Glykosidasy

1.1.1. Charakterizace a klasifikace glykosidas

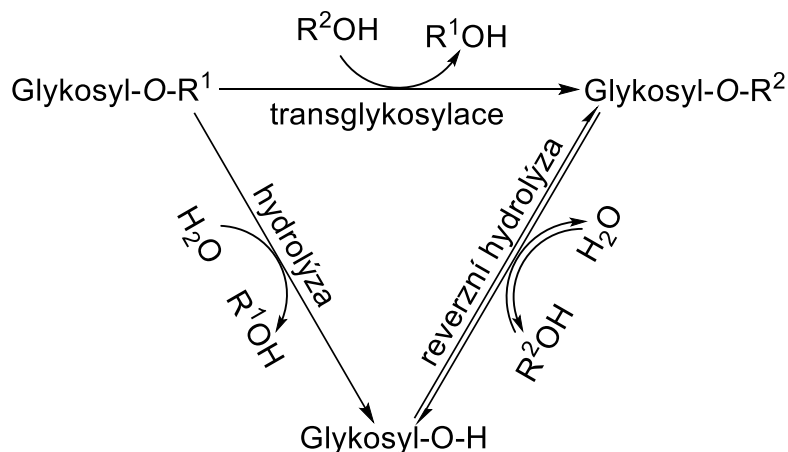
Glykosidasy neboli O-glykosidhydrolasy (EC 3.2.1.) jsou enzymy, které *in vivo* katalyzují ke štěpení di-, oligo- a polysacharidů. Při tomto procesu je glykosylový zbytek po odštěpení aglykonu přenesen na vodu [1].

Glykosidasy se rozdělují do dvou podskupin na základě způsobu štěpení. První podskupinou jsou exoglykosidasy, které štěpí sacharidové jednotky z neredukujícího konce. Druhou skupinou tvoří endoglykosidasy, kterým byla věnována pozornost teprve v 90. letech minulého století. Endoglykosidasy štěpí sacharidový řetězec uvnitř, a tak na akceptor přenášejí celé oligosacharidové řetězce [1]. K dnešnímu dni je již rozpoznáno a popsáno více než 120 rodin glykosidas s podobnou strukturou [2] dle databáze CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*, <http://www.cazy.org/>) [3].

Způsob, kterým glykosidasy vytvářejí glykosidové vazby, závisí na struktuře substrátu a složení reakčního média. Při termodynamicky řízeném procesu tzv. „reverzní hydrolýzy“ spojují glykosidasy volný monosacharid s nukleofilem za uvolnění molekuly vody [1]. Z chemického hlediska se jedná o reakci kondenzační. Reakční rovnováhu těchto reakcí lze ovlivnit několika způsoby. Prvním způsobem je snížení aktivity vody v reakční směsi vysokou koncentrací výchozích látek (v tomto případě monosacharidů) [4], dalšími způsoby je například přidání solí [5], postupné odebírání produktů reakce [4] nebo použití organických rozpouštědel [6]. Co se týká dosažení reakční rovnováhy v přiměřeném časovém úseku, je vhodné zvýšit reakční teplotu až k hranici 50 °C [7]. I při zvýšení reakční teploty se reakční doby pohybují od několika hodin po několik dní, dokonce v některých případech i týdnů, a výtěžky málokdy přesahují 15 %. Reverzní hydrolýza je široce využívaný způsob glykosylace především primárních alkoholů. I přes menší výtěžky se podařilo pomocí této metody připravit několik

pozoruhodných produktů, jako jsou například thioglykosidy [2] nebo neredukující oligosacharidy [8,9].

U kineticky řízené tvorby glykosidové vazby, tzv. transglykosylace, vzniká méně vedlejších produktů v reakční směsi a požadovaný produkt se většinou tvoří s větší selektivitou. Transglykosylace může probíhat za použití donorů glykosylu, u nichž je aglykon dobře odstupující skupina (např. *p*-nitrofenyl) [1].



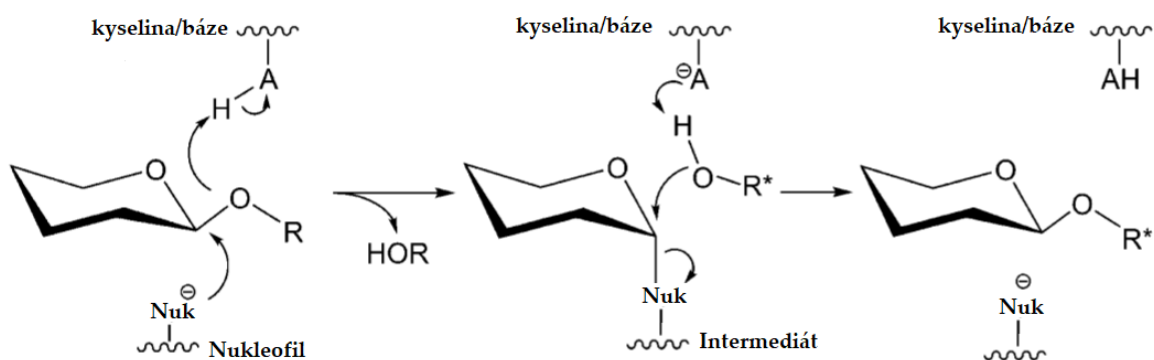
Obr. 1: Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami (převzato a upraveno z [10])

1.1.2. Mechanismus reakce katalyzované glykosidasami

Glykosidové vazby jsou enzymaticky hydrolyzovány dvěma hlavními skupinami glykosidas: retenujícími a invertujícími. Invertující glykosidasy během hydrolyzy převrací anomerní konfiguraci substrátu za vzniku produktu s opačnou anomerní konfigurací. Retenující glykosidasy, mezi které patří i β -galaktosidasa, zachovávají anomerní konfiguraci. V první fázi přijímá kyslíkový atom anomerního centra proton z katalytického acidobazického zbytku enzymu. Konfigurace anomerního centra substrátu se převrací a vzniká intermediát enzym-glykosyl. Před vznikem tohoto intermediátu se systém dostává do prvního tranzitního stavu, kdy je katalytický nukleofilní zbytek enzymu stále dost daleko od anomerního uhlíkového atomu substrátu, stejně tak jako donorový proton vodíku, který je stále navázán ke kyselině. Druhý krok zahrnuje aktivaci molekuly vody deprotonovaným acidobazickým zbytkem a následuje druhý tranzitní stav,

kdy vytvořená kovalentní vazba mezi anomerním uhlíkem a nukleofilní skupinou je téměř rozštěpena a dochází k přiblížení kyslíku z molekuly vody a proton z molekuly vody se přiblíží ke zbytku kyseliny nebo báze. Po následném ataku intermediátu dochází k zpětnému převrácení konfigurace na anomerním centru substrátu, takže výsledkem je produkt o stejné anomerní konfiguraci jako výchozí substrát [15].

Ukazuje se, že přítomnost krátkého vodíkového můstku mezi nukleofilní skupinou a 2'-OH galaktosylu, stejně tak jako planarizace galaktosylu směrem k poloviční židličkové konformaci, jsou důležitými jevy při snižování aktivační energie a stabilizaci vznikajícího oxokarbeniového iontu. Mimo jiné hraje velmi důležitou roli přítomnost hořečnatých iontů; jejich absence výrazně zvyšuje aktivační bariéru [16].



Obr. 2: Mechanismus reakce katalyzované β -galaktosidasou (převzato a upraveno z [16])

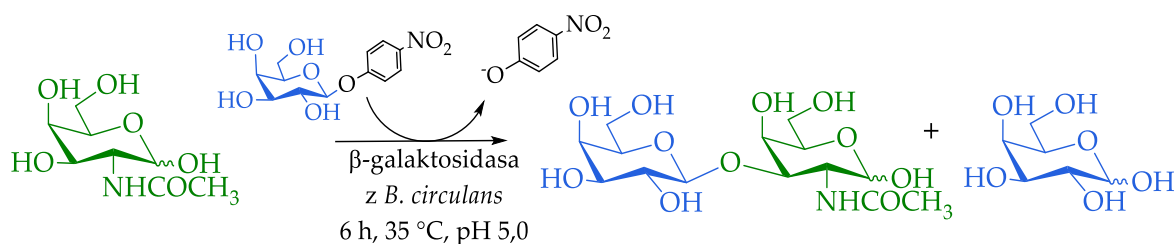
1.1.3. β -Galaktosidasy

β -Galaktosidasa je velmi rozšířený enzym, který lze najít jak u mikroorganismů a rostlin, tak u živočichů [11]. Má fyziologicky významnou roli, neboť poskytuje energii a zdroj uhlíku z hydrolyzy laktosy na galaktosu a glukosu. Tento enzym se mimo jiné využívá v potravinářském průmyslu pro výrobu bezlaktózového mléka [12].

Jedním z běžných zdrojů β -galaktosidas je mikroorganismus *Bacillus circulans*. Song *et al.* v něm identifikovali čtyři isoformy β -galaktosidasy a označili je jako β -galaktosidasa-A (BgaA), β -galaktosidasa-B (BgaB), β -galaktosidasa-C (BgaC)

a β -galaktosidasa-D (*BgaD*) [13].

Tyto enzymy mají schopnost štěpit glykosidovou vazbu $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ z neredukujícího konce di- a oligosacharidů [11]. Při potlačení hydrolytické funkce se tato regioselektivita využívá i při syntéze vazeb $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$. Na rozdíl od většiny glykosidas, které se průmyslově využívají hlavně ke štěpení sacharidů, je β -galaktosidasy z *B. circulans* využívána ve větším měřítku i k syntéze, zvláště k průmyslové přípravě směsí galaktooligosacharidů z laktosy. Její výhoda je, kromě vyšších výtěžků, v její teplotní stabilitě a širokém rozmezí pH, kdy je aktivní [14]. Připravené galaktooligosacharidy jsou strukturně podobné těm, jež se přirozeně vyskytují v mateřském mléce, a tak působí jako účinná probiotika [14]. β -Galaktosidasa z *Bacillus circulans* *BgaC* katalyzuje přenos galaktosového zbytku (galaktosylu) z vhodných donorů (např. *p*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid; *p*NP-Gal) na akceptor.



Obr. 3: Transglykosylace a hydrolýza katalyzované β -galaktosidasou z *Bacillus circulans*

Jak již bylo zmíněno (viz str.11), u transglykosylačních (syntetických) reakcí probíhá do jisté míry vždy paralelní hydrolýza, protože vzniklý produkt je zároveň substrátem pro daný enzym, což do jisté míry snižuje výtěžek reakcí. Tento problém se dá vyřešit proteinovým inženýrstvím (cílenou mutagenézí) [2], nejčastěji přípravou tzv. glykosynthas, kdy je katalytický nukleofilní zbytek (obvykle Glu nebo Asp) zaměněn za jiný zbytek. Mutantní enzym nemá již hydrolytickou aktivitu, ale dokáže reagovat s glykosylfluoridy opačné anomerní konfigurace než původní substrát (např. α -galaktosylfluorid pro β -galaktosidasu). Například glykosynthasa *BgaC-Glu233Gly* katalyzuje přenos galaktosylu na akceptor *N*-acetylglukosamin za vzniku $\beta(1\rightarrow3)$ vázaného *N*-acetylglukosaminu typu 1 [2].

1.2. Galektiny

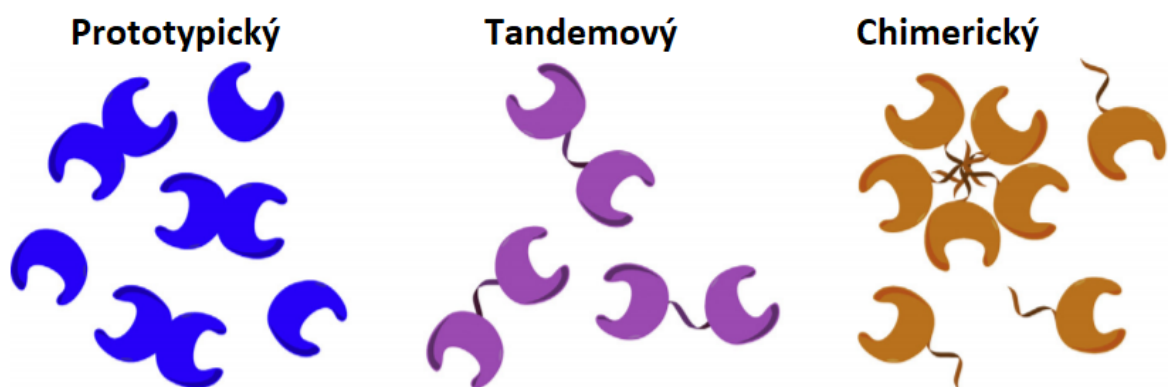
1.2.1. Klasifikace a charakteristika

Lektiny jsou definovány jako proteiny, které jsou schopny přednostně rozpoznávat a vázat sacharidové komplexy například z glykolipidů a glykoproteinů. Podle zdroje, ze kterých jsou získávány, dělíme lektiny na rostlinné, živočišné, houbové a bakteriální. Dále je lze dělit do menších podskupin například podle typu jejich sacharidového ligandu.

Jednou skupinou živočišných lektinů jsou galektiny neboli lektiny S-typu. Jejich funkce je založená na vytváření oligomerů nekovalentními vazbami, které mohou vést až ke vzniku zesítených mřížek na buněčném povrchu [17]. Tato oligomerizace vede k mnoha signalizačním kaskádám, které jsou zapojené do fyziologických funkcí v organismu, jako například zánětlivá reakce, modulace imunitní odpovědi, patologické jevy spojené s fibrotickými procesy, kancerogenezí a dalšími onemocněními. Kromě rakoviny je nadprodukce některých galektinů spojována s nemocemi jako idiopatická pulmonární fibróza a srdeční onemocnění [18]. Galektiny mají charakteristickou konzervovanou strukturu domény rozpoznávající sacharidy (*carbohydrate recognition domain*; CRD) [19] a vykazují afinitu k cukerným strukturám obsahujícím terminální β -galaktosid [20]. Existuje celkem patnáct druhů galektinů (Gal-1-15). U galektinů můžeme najít tři rozdílné strukturní formy; rozpoznáváme galektiny prototypické, tandemové anebo chimerické. Mezi prototypické patří galektiny Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 a -14. Tato skupina se může vyskytovat v závislosti na molární koncentraci jako monomer obsahující jednu CRD doménu nebo elektrostatický homodimer dvou monomerů. Galektin-3 je jediným zástupcem galektinů chimérického typu. Obsahuje krátkou N-terminální sekvenci aminokyselin tvořenou 8-12 segmenty opakujících se devíti aminokyselin, podobně jako u kolagenu. N-terminální doména je připojena k C-terminální CRD doméně. Galektiny tandemového typu zahrnují Gal -4, -6, -8, -9 a -12 [21].

CRD doména galektinů se skládá přibližně ze 130 aminokyselin a jejím typickým strukturním motivem jsou dva mírně zahnuté antiparalelní skládané β -listy [23]. Šest řetězců tvoří tzv. konkávní stranu a pět řetězců pak stranu konvexní. Konkávní strana vytváří pomyslný žlábek, který je místem pro navázání sacharidových ligandů. U Gal-3 je například toto vazebné místo dostatečně dlouhé pro navázání lineárního tetrasacharidu [24].

Aminokyseliny se přímo účastní tvorby vodíkových vazeb a van der Waalsových interakcí se sacharidovým ligandem. Důležitým motivem je sekvence aminokyselin His-Asn-Arg. Tento motiv je významný při tvorbě vodíkových vazeb sacharidů obsahujících galaktosylový zbytek například u Gal-1 [25], Gal-3 [26] a Gal-8 [27].



Obr. 4: Vizualizace tří strukturních motivů galektinů (převzato a upraveno z [22])

1.2.2. Funkce galektinů *in vivo*

Galektiny se podílejí na řadě biologických procesů včetně patologických a mají širokou škálu funkcí v lidském organismu. V buňkách se vyskytují jak intracelulárně, tak extracelulárně. Mezi jejich funkce patří například apoptóza, mezibuněčná signalizace, migrace, diferenciacce a adheze buněk, imunologická odpověď, sestřih pre-mRNA a další [28]. Často jsou galektiny spojovány s patofyziologickými procesy kancerogeneze. Určité typy galektinů v krevním séru indikují zvýšenou pravděpodobnost výskytu některých typů nádorů, což z nich dělá potenciální markery rakovinného bujení [29].

1.2.3. Galektin-1

Galektin-1 (Gal-1) se v roztoku vyskytuje jako homodimer v závislosti na koncentraci. Struktura tohoto proteinu je β -sendvič tvořený ze dvou antiparalelních β -listů z F1-F5 A S1-S6a/b vláken [30]. Zpravidla se vyskytuje uvnitř buněk, odkud je vylučován do vnějšího okolí buňky po aktivaci imunitním systémem. Zvýšená exprese Gal-1 je často spojená s maligními novotvary v tkáních jako tlusté střevo, plíce, slinivka břišní a játra. Zvýšenou koncentraci Gal-1 v krvi lze detekovat i při rakovině plic a štítné žlázy.

Gal-1 se ukazuje jak v úloze iniciátoru, tak inhibitoru buněčné adheze. Názorným příkladem je jeho funkce v kosterním svalstvu, kam je vylučován během diferenciaci a vazbě na laminin [31]; inhibuje zde interakci mezi myoblastem a matrixem [28]. Naproti tomu může Gal-1 podporovat adhezi buňka-matrix pro jiné typy buněk pravděpodobně pomocí zesíťování mezi povrchem buňky a glykokonjugátem [32,33,34]. Gal-1 je také spojován s imunosupresivními stavy, kdy stimuluje apoptózu u aktivovaných CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Zkoumání možné terapie se zaměřením na Gal-1 může sloužit k restrikci šíření nádorových buněk a růstu nádoru samotného [35].

V současné době má anti-angiogenní léčba několik omezení, související hlavně s různými stupni odpovědi a resistance. Předpokládá se, že je to způsobeno právě mechanismy nezávislými na vaskulárním endoteliálním růstovým faktoru (VEGF) [36]. V místech se sníženým okysličením přežívají nádorové buňky zvýšenou regulací exprese tzv. hypoxií indukovatelného faktoru 1 (HIF-1a) [37]. Studie ukazují, že buněčné linie rakoviny tlustého střeva a konečníku kultivované v hypoxickém prostředí produkují mnohem více Gal-1, což koreluje se zvýšenou hladinou hypoxických faktorů jako HIF-1a a karboanhydrázy IX (CAIX) [38]. Studie popsané v této části naznačují, že inaktivace Gal-1 v nádorových buňkách vede ke zvýšení sensitivity chemoterapeutik.

1.2.4. Galektin-3

Galektin-3 (Gal-3) je jediným zástupcem skupiny galektinů chimerického typu. Gal-3 se skládá z kolagenové sekvence, tedy části bohaté na prolin a glycin, C-terminální domény s CRD a N-terminální domény se dvěma fosforylačními místy [36]. CRD doména se skládá ze 110-130 aminokyselin se sekvenčním motivem NWGR (Asn-Trp-Gly-Arg). Tyto aminokyseliny hrají důležitou roli v interakci s proteiny ze skupiny Bcl-2. Skupina proteinů Bcl-2 je zajímavá tím, že se jedná o hlavní anti-apoptotické činitele [39]. Právě CRD doména Gal-3 je mimo jiné zodpovědná za vázání cukrů. Gal-3 má vyšší afinitu k oligosacharidům obsahujícím terminální galaktosid než k samotnému monosacharidu jako například *N*-acetyllaktosaminu [36]. Vazebné místo pro sacharidy na CRD doméně má 5 částí (A-E), kdy části C a D jsou silně evolučně konzervované; do části C se váže β -galaktosid, jenž je základním strukturním motivem ligandů Gal-3 [40]. N-terminální doména Gal-3 je zodpovědná za oligomerizaci galektinových monomerů, zvláště vznik pentamer, což je fyziologický proces nutný pro biologickou funkci Gal-3 [41].

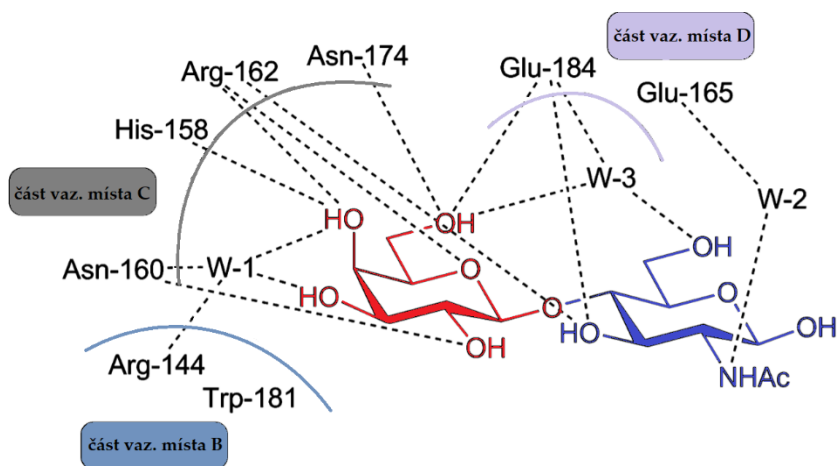
Gal-3 se vyskytuje v určité míře jak ve zdravé tkáni, tak ve zvýšené míře ve tkáni patologické. Díky přímé spojitosti zvýšené hladiny Gal-3 s procesy proliferace, zánětu, adheze rakovinných buněk a apoptózy [42] v tkáních jako jsou štítná žláza, tlusté střevo, slinivka břišní, ledviny a plíce [43] se Gal-3 jeví jako potenciálně zajímavý nástroj např. při imunohistochemickém stanovení benigních a maligních uzlů štítné žlázy [44].

V závislosti na své lokalizaci v rámci buňky má Gal-3 rozdílné funkce; například může působit jak pro-, tak i proti apoptoticky [35]. V jádře je Gal-3 zodpovědný za genovou expresi přes transkripční faktory SP1 a β -catenin [45]. V cytoplazmě reguluje Gal-3 početné množství proteinů spjaté s rakovinou a maligními procesy jako jsou například signální molekula RAS, která svou mutací může způsobovat rakovinu [46], protein BCL-2, jenž je důležitým regulátorem při programované buněčné smrti [47], a protein MYC zastupující větší skupinu

proteinů regulující geny a proto-onkogeny pro transkripční faktory [48]. Dále snižuje Gal-3 imunitní odpověď organismu potlačením indukci apoptózy T-lymfocytů a NK buněk [49].

1.3. Vybrané sacharidové ligandy galektinů

Ligandy galektinů jsou sacharidy, které obsahují terminální β -galaktosid. Sacharidové ligandy se na galektiny vážou nekovalentní interakcí do vazebného místa na CRD doméně. Hodnota energie této vazby se pohybuje mezi hodnotou energie van der Waalsových sil a kovalentní interakce [50]; jedná se primárně o vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami sacharidu a aminokyselinami ve vazebném místě galektinu. Tyto vazby hrají celkově důležitou roli v biochemických procesech díky své dynamické asociaci/disociaci [50]. Mezi další interakce galektin-sacharid patří iontové a hydrofobní interakce a interakce zprostředkované vápenatými ionty. Mezi přirozené ligandy galektinů patří laktosa nebo LacNAc. [50].



Obr. 5: Interakce disacharidu LacNAc s aminokyselinami ve vazebném místě na CRD doméně Gal-3 (převzato a upraveno z [50])

1.3.1. Thomsen-Friendenreichův antigen

Thomsen-Friendenreichův antigen (TF antigen), je disacharid s terminální galaktosou navázanou vazbou $\beta(1\rightarrow3)$ k *N*-acetylgalaktosaminu, tj. Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc. Tento motiv je na glykoproteiny navázán v α -konfiguraci. TF antigen je disacharid mucinového typu [51]. Je exprimován na vnějším povrchu T lymfocytů a většiny lidských karcinomů [52] včetně karcinomu prsa a prostaty [53]. V nádorových buňkách se podílí na adhezi a tvorbě metastáz, což bylo nejdříve prokázáno u myších lymfomů a hepatocytů a později i u prsního karcinomu [54].

TF antigen interaguje *in vivo* s Gal-3 při vazbě nádorové buňky na endotel. Studie z roku 2001 poukazuje na možnost inhibice této interakce pomocí syntetických látek, což by mohlo vést k dalšímu způsobu léčby nádorových onemocnění [55].

1.3.2. *N*-Acetylaktosamin

N-Acetylaktosamin (LacNAc) je přirozeně se vyskytující disacharid tvořený terminální galaktosou navázanou na *N*-acetylglukosamin. Vyskytuje se ve dvou regioizomerních formách označených jako typ 1 a typ 2.

N-Acetylaktosamin typu 1 (LacNAc typ 1; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc) je znám jako stavební kámen epitopů několika krevních skupin [56]. Tyto epitopy se účastní řady biologických procesů, jako například fertilizace [57] a adheze některých patogenů [58]. Dále se LacNAc typ I objevuje v mateřském mléce [59], v gastrointestinální tkáni [60] a v plicích [61]. LacNAc typu I je považován za nádorový marker, jelikož také hraje důležitou roli při vzniku metastáz [62].

N-Acetylaktosamin typu 2 (LacNAc typ 2) obsahuje na rozdíl od typu 1 glykosidovou vazbu v konfiguraci $\beta(1\rightarrow4)$. LacNAc typ 2 je znám jako základní struktura v oligosacharidech typu poly-LacNAc, které jsou dále zastoupeny například v glykoproteinech a glykolipidech [63,64].

1.3.3. *N,N'*-Diacetyllaktosamin

Disacharid *N,N'*-diacetyllaktosamin (β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc; LacdiNAc) je další ze zástupců disacharidů přírodního původu, které fungují jako ligandy galektinů. LacdiNAc byl hojně nalezen u bezobratlých, např. u cizopasných červů [65]. Tyto struktury byly nalezeny na jejich povrchu a povrchu jejich vajíček při onemocnění schistosomóza, kterou vyvolává parazitická motolice *Schistosoma*. Sacharidové antigeny na vajíčkách jsou potenciální imunogeny a protilátky proti LacdiNAc antigenům byly detekovány v séru infikovaných pacientů [66,67,68].

1.4. Metody stanovení interakce galektinů

1.4.1. ELISA

Jednou z často využívaných analytických metod v této práci je metoda ELISA (angl. „*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*“). Metodu ELISA lze použít v kvalitativním i kvantitativním typu stanovení. Její výhodou je získání velkého množství dat za poměrně krátký časový úsek.

Počátky této metody se datují do 60. let 20. století jako odpověď na snahu navrhnout metodu nezávislou na radioaktivním značení; v tomto případě spojením imuno-eseje s enzymatickým stanovením. Tuto ideu sdíleli dva na sobě nezávislé výzkumné týmy a demonstrovaly jeho proveditelnost. První z týmu byl pod vedením P. Pertlanna a E. Engvalla ze Švédské univerzity ve Stockholmu. Druhá výzkumná skupina byla vedena A. Schuursem a B. van Weemenem ve firmě Organon NV v Nizozemí [69].

Nejprve se tato metoda setkala s vlnou pochybností, jak by mohla být tak objemná a velká molekula jako enzym připojená k antigenu nebo protilátce, aniž by stericky bránila vazbě. Později v období 1966-1969 zveřejnila skupina vedena S. Avrameas z Villejuif, Francie, úspěšné pokusy spojení protilátek a antigenů s detekčními enzymy alkalickou fosfatásou (EC 3.1.3.1) a glukosaoxidasou (EC 1.1.3.4) pomocí glutaraldehydu [70,71]. Následovala kvantitativní analýza IgG

v králíčím séru a v témže roce publikovali van Weeman a Schuurs práci, kdy kvantifikovali množství těhotenského hormonu HCG v moči pomocí křenové peroxidasy (EC 1.11.17) [69].

Na přelomu 60. a 70. let se tato technika zaběhla, a dala tak pevný základ komerčně dostupným ELISA soupravám, jejichž základem je mikrotitrační destička s 96 jamkami vyrobená z plastového materiálu adsorbujícího proteiny. Mimoto dal rozvoj této metody vznik dalším nástrojům ulehčujícím práci s destičkou, jako například multikanálová pipeta, čtečka destiček a automatická pipeta [69].

Základem každé ELISA metody je imobilizovaný antigen/protilátka/protein na dně jamky, na něž se v závislosti, o jaký typ ELISA měření se jedná, vážou další komponenty. V závislosti na tom, zda se stanovuje antigen, vaznost, nebo koncentrace se dá ELISA rozdělit do čtyř hlavních kategorií: přímá ELISA, nepřímá ELISA, sendvičová ELISA a kompetitivní ELISA [72].

Přímá ELISA je jedním z nejrychlejších stanovení, jelikož je třeba mnohem méně kroků. V praxi to znamená, že se na dně jamky imobilizuje antigen, který je přímo detekován protilátkou s připojeným enzymem pomocí substrátu. Předností této metody je hlavně její rychlost a díky málo krokům i menší náchylnost na chyby. Nevýhodou je nespecifické vázání proteinů na jamku a potřeba mít specifickou protilátku proti danému proteinu [72].

U nepřímého stanovení ELISA je základem též imobilizovaný antigen. Ten se značí primární protilátkou a primární protilátka je následně označena sekundární protilátkou s konjugovaným enzymem, který barevně reaguje se substrátem. Výhoda nepřímého ELISA stanovení je větší univerzálnost ve výběru protilátek díky kroku navíc, což zvyšuje její citlivost ke specifickému analytu. Zároveň krok navíc je i jejím úskalím, protože je časově náročnější a je třeba optimalizovat i vzájemnou koncentraci obou protilátek pro minimalizaci nespecifické reakce a zároveň maximalizaci odpovědi [72].

Jednou z nejpoužívanějších metod ELISA je metoda sendvičová. Je to metoda, při které se dno jamky pokryje vrstvou protilátek proti stanovovanému

antigenu, poté je přidán vzorek. Pokud vzorek obsahoval daný antigen, je antigen v dalším kroku označen detekční protilátkou s navázaným enzymem a detekován přidavkem substrátu např. spektrofotometricky. Pokud vzorek neobsahoval antigen, zůstává jamka bez reakce [72].

Posledním základním typem je kompetiční nebo také inhibiční ELISA. Je to jedna z komplexnějších technik. Dno jamek je pokryto stanovovaným antigenem. Zároveň se preinkubují vzorky s primární protilátkou. Primární protilátky, které se ve vzorku nenavážou na antigen, se vážou na antigen imobilizovaný na dně jamky. Sekundární protilátka s enzymem pak označí primární protilátky navázané na antigen v jamce. Enzymovou reakcí se substrátem se označí ty jamky, v nichž nebyl přítomen v původním vzorku antigen [72].

Vyhodnocování těchto stanovení závisí na tom, zda se jedná o výsledek kvalitativní nebo kvantitativní. Pokud se jedná o výsledek kvalitativní, stačí pouhé vizuální vyhodnocení. Při stanovení kvantitativní je potřeba využít spektrofotometrickou analýzu. Změření intenzity zabarvení jamky substrátem při určité vlnové délce dává kvantitativní informaci o množství analytu v původním vzorku.

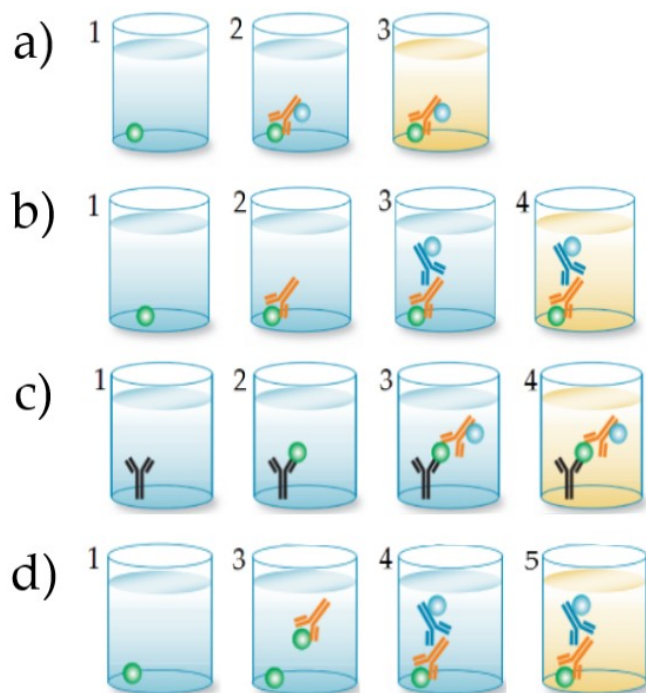
Pro vyhodnocení se využívá především dvou modelů vyhodnocení dat. Prvním modelem je standardní lineární regrese. V tomto modelu se vytvoří kalibrační přímka ze standardizovaných roztoků o jasné koncentraci a následně se odvodí koncentrace analytu v původním vzorku s využitím Lambert-Beerova zákona (vztah 1):

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon_{\lambda} \quad (1)$$

kde A je absorbance, c koncentrace absorbující složky [mol l^{-1}], l je délka absorpční vrstvy [cm] a ε_{λ} molární absorpční koeficient [$\text{l cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$].

Druhým modelem je nelineární regrese, kdy se vynáší naměřené absorbance proti dekadickému logaritmu koncentrace analytu. Typickým výsledkem je

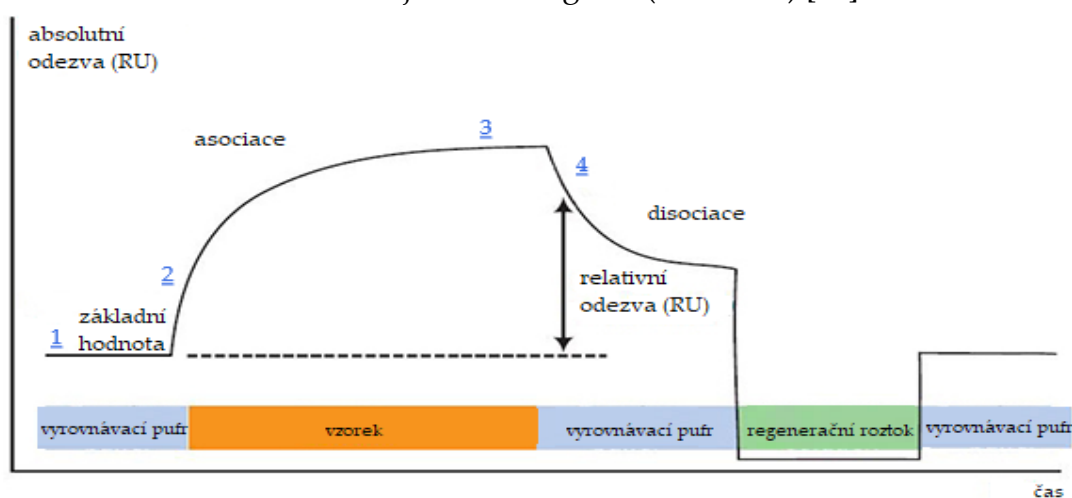
sigmoida. Těto metody se zpravidla využívá pro výpočet poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC_{50} , popř. EC_{50} či ED_{50}) [73].



Obr. 6: Grafické zobrazení typů ELISA metod (převzato a upraveno z [72]) **a)** 1- dno jamky pokryté imobilizovaným antigenem, 2- navázání protilátky konjugované s enzymem na imobilizovaný antigen, 3- kolorimetrická změna jamky po přidání substrátu; **b)** 1- dno jamky pokryté imobilizovaným antigenem, 2- navázání primární protilátky na imobilizovaný antigen, 3- navázání sekundární protilátky konjugované s enzymem na primární protilátku, 4- kolorimetrická změna jamky po přidání substrátu; **c)** 1- dno jamky pokryté imobilizovanou protilátkou, 2- navázání antigenu na imobilizovanou protilátku, 3- připojení sekundární protilátky konjugované s enzymem na antigen a vytvoření „sendviče“, 4- kolorimetrická změna jamky po přidání substrátu; **d)** 1- dno jamky pokryté imobilizovaným antigenem, 2- navázání zbylé protilátky z preinkubovaného vzorku, 3- připojení sekundární protilátky konjugované s enzymem na stanovenou protilátku, 4- kolorimetrická změna jamky po přidání substrátu

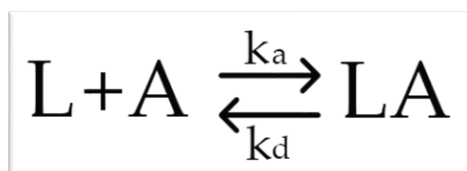
1.4.2. Povrchová plasmonová rezonance

Povrchová plasmonová rezonance (angl. „*surface plasmon resonance*“; SPR) je proces, který se využívá k analýze interakcí biomolekul s různými ligandy, od malých částic jako ionty až po viry v reálném čase. Tato technika poskytuje informace o interakci ligandu a analytu ohledně vaznosti, kinetiky, afinity, specifity a koncentrace, aniž by musel být jeden nebo druhý vazebný partner zvlášť značen. Jev povrchové plasmonové rezonance nastává, když polarizované světlo zasáhne elektricky vodivý povrch na rozhraní dvou médií. Tím se generují vlny hustoty elektronového náboje nazývané plazmony. Generováním plazmonů je ve specifickém úhlu snížena intenzita odraženého světla úměrná hmotnosti analytu navázaného na ligand imobilizovaný na povrchu senzoru. Tento úhel se nazývá úhel rezonanční [74]. V obvyklém uspořádání tohoto stanovení jsou analyzované struktury (ligandy), ve většině případů proteiny, imobilizovány na povrchu komerčního biosenzorového čipu. Vzorek obsahující potenciálně interagující molekulu (analyt) je přítomen v roztoku, kterým je v sérii koncentrací omýván biosenzor a dochází k interakci s cílovou strukturou. Během těchto interakcí se polarizované světlo směřované k povrchu senzoru odráží v úhlu, který se postupně mění v závislosti na tom, jak se molekuly vážou a disociují. Tento proces je zaznamenáván v reálném čase jako sensorgram (viz obr. 7) [74].



Obr. 7: SPR sensorgram (převzato a upraveno z [74]) - 1- odezva při průtoku pufru, 2- začátek zachytávání analytu v nanášeném vzorku, 3- maximální odezva při plném nasycení čipu analytem 4- snižující se odezva při vymývání zachyceného analytu

Sensorgram je tvořen ze sensorgramovou křivkou, která dává informaci o průběhu asociace a disociace v závislosti na čase. Dává také informaci o ustáleném stavu, kdy je neměnný počet vazeb mezi analytem a ligandem. Využívá se několik kinetických modelů, které lze aplikovat na naměřená data, přičemž jevy jako heterogenita imobilizovaných látek, znovunavázání analytu atd. mohou mít menší či větší vliv na výsledek analýzy. Mezi základní kinetické modely patří model jeden ligand – jeden analyt (tzv. model *one-to-one*), viz obr. 8. Fáze asociace se na sensogramu vynáší jako hodnota již zformovaných komplexů ligand-analyt v závislosti na čase a dostáváme hodnotu rychlostní asociace k_a . Po nasycení povrchu dochází k vymývání analytu puřem. Signál na sensogramu pomalu klesá a dostáváme informaci o rozpadu komplexů ligand-analyt v závislosti na čase, charakterizovaném rychlostní konstantou disociace k_d . Poměr k_d/k_a dává informaci o rovnovážném stavu interakce označovaném jako rovnovážná disociační konstanta K_D . Dalšími modely jsou například analýza bivalentních analytů, kinetická titrace, analýza rovnováhy nebo analýza přenosu hmoty [75].

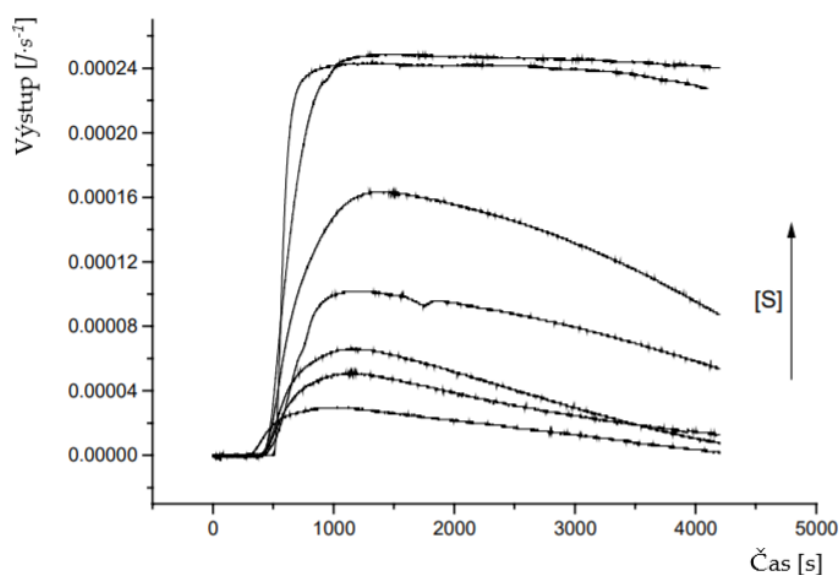


Obr.8: Kinetický model jeden ligand – jeden analyt. L – ligand; A - analyt; LA - komplex ligand - analyt; k_a – rychlostní konstanta asociace; k_d – rychlostní konstanta disociace

1.4.3. Izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie (angl. „*isothermal titration calorimetry*“, ITC) je technika široce využívaná pro měření biochemických interakcí makromolekul s jejich ligandy pomocí termodynamických změn v soustavě. Velkou výhodou je, že není potřeba žádné modifikace ani jednoho z vazebných partnerů, a tak se jejich vaznost měří v roztoku v jejich nativních stavech [76, 77].

Měření probíhá ve dvou celách. Jedna cela plní funkci referenční a obsahuje vodu a druhá obsahuje analyzovaný vzorek (např. protein nebo jinou makromolekulu). Při této metodě je nutné držet teplotu obou cel naprosto stejnou. Po nástřiku malého objemu roztoku ligandu k analyzovanému vzorku dochází k vazbě, která se projevuje změnou entalpie a ve výsledku rozdílem teplot obou cel. Součástí soupravy je tepelné čidlo schopné detekovat až jednu miliontinu stupně Celsia. Jakmile detekuje změnu teploty, dává signál ohřívači. Ten kompenzuje vzniklý rozdíl teplot a vrací cely do rovnovážné teploty. Každý jednotlivý nástřik dává signál formou píku, který je úměrný množství tepla potřebného pro úpravu teplot. Plocha každého píku je poté integrována a vynesena do grafu proti molárnímu poměru ligandu vůči proteinu. V ideálním případě je po navázání



Obr. 9: Příklad kalorimetrického záznamu měření kinetiky enzymové reakce se rozdílným množstvím počátečního substrátu (převzato a upraveno z [79])

struktur zaznamenán signál, který lze proložit sigmoidní křivkou. Z naměřených teplotních změn lze přesně určit rovnovážnou disociační konstantu (K_D), popřípadě IC_{50} , reakční stechiometrii, entalpii a entropii. Mimo jiné se tato metoda také využívá pro měření kinetiky enzymů [77]. Kinetika enzymů prvního řádu je popisována vztahem 2:

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H \cdot V \cdot k \cdot c_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

kde dQ označuje uvolněné teplo za jednotku času [J], ΔH reakční entalpii [J], V reakční objem [dm^3], k rychlostní konstantu [s^{-1}], c_0 počáteční koncentrace substrátu [$mol\ l^{-1}$] a t čas [s] [78].

2. Cíl práce

- Rekombinantní exprese, purifikace a charakterizace β -galaktosidasy z *Bacillus circulans* (BgaC) v *Escherichia coli*
- Optimalizace reakčních podmínek pro enzymovou syntézu disacharidů TF antigen a LacNAc typ 1
- Syntéza a izolace obou disacharidů
- Stanovení afinity připravených disacharidů pomocí imunochemické metody ELISA k rekombinantním galektinům Gal-1 a Gal-3

3. Experimentální část

3.1. Seznam použitých chemikálií

- 6× DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Acetonitril (VWR Chemicals, Česká republika)
- Akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika)
- Amoniak, 25% vodný roztok (Lach-Ner, Česká republika)
- Ampicilin (Serva Electrophoresis GmbH, Německo)
- Asialofetuin (Sigma Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Bromfenolová modř (Serva, Německo)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- *Coomassie Brilliant Blue* (USB Corporation, USA)
- Destilovaná a ultračistá voda (filtrační zařízení WATREX)
- Dihydrogenfosforečnan sodný, mohohydrát (Carl Roth, Německo)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Plasmid *pET-Duet-1-bgaC* nesoucí konstrukt genu β -galaktosidasy z *Bacillus circulans* (poskytl v rámci spolupráce prof. L. Elling, RWTH Aachen, SRN)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- EDTA (Carl Roth, Německo)
- Ethanol (VWR Chemicals, Česká republika)
- *Escherichia coli* BL21 Gold DE3 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Glycerol dvakrát destilovaný 99,5 % (VWR Chemicals, Česká republika)
- HEPES (Megazyme, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Kapalný dusík (Maneko, Česká republika)
- Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová (VWR Chemicals, Česká republika)

- Kyselina sírová (VWR Chemicals, Česká republika)
- Myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidasou (anti-His₆-peroxidasa), ředění 1:1000 v 1×PBS (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- *p*-Nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid (*p*NP-Gal; Senn Chemicals, Švýcarsko)
- Nízkomolekulární proteinový marker – *Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie)
- *N,N'*-Methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (Gold Biotechnology, USA)
- SDS (Serva, Německo)
- Substrát TMB One; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Kem-En-Tec, Dánsko)
- TEMED (Sigma-Aldrich, USA)
- TLC hliníkové destičky potažené vrstvou silikagelu (Macherey-Nagel, Německo)
- Tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypton (Oxoid, Česká republika)
- Uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)

3.2. Seznam roztoků a médií

- 12% SDS gel
 - Separáčnı gel (1,6 ml H₂O, 2,0 ml 30% akrylamid, 1,3 ml Tris-Cl (1,5 M, pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH₄)₂S₂O₅, 0,002 ml TEMED)
 - Zaostrřovací gel (3,4 ml H₂O, 0,83 ml 30% akrylamid mix, 0,63 ml Tris-Cl (1,0 M, pH 6,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH₄)₂S₂O₅, 0,005 ml TEMED)
- 3 mol/l HCl- 66 ml HCl, 186 ml ultračisté vody
- 2% BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)
- 5% kyselina sírová (H₂SO₄) v ethanolu

- 5× vzorkový pufr (5 ml) - 0,151 g Tris; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolová modř; 1,25 ml glycerol
- 5× elektrodový pufr (1 l) - 5 g SDS; 15 g Tris; 94 g glycin
- Acetátový pufr - 0,1 M CH₃COOH, 0,2 M CH₃COONa (pH 5,0)
- Bradfordovo činidlo - 0,01% *Coomassie Brilliant Blue* G-250, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě
- Barvicí roztok (100 ml)
0,25 g *Coomassie Brilliant Blue* R250; 45 ml methanol; 45 ml H₂O; 10 ml 99% kyselina octová
- Ekvilibrační pufr - 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol (pH 7,4)
- Eluční pufr - 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol (pH 7,4)
- Elektrodový pufr – 25mM Tris, 150mM glycin, 10% SDS
- Fosforečnanový pufr - 16 ml 0,2 M NaH₂PO₄, 84 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 100 ml ultračisté vody (pH 7,5)
- LB (Luria-Bertani) médium (100 ml) - 1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl
- LBA médium (100 ml) - 1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl, 2 g agarosa
- McIlvain pufr – 0,1M kyselina citronová, 0,2M Na₂HPO₄ (pH 5,0)
- Odbarvovací roztok (1 l) - 350 ml ethanol; 100 ml kyselina octová; 550 ml H₂O
- PBS (pH 7,5) - 8,76 g 0,15 M NaCl, 6,9 g 0,05 M NaH₂PO₄. H₂O v 1000 ml ultračisté vody
- Promývací roztok PBST – 0,05% Tween 20 v PBS
- TB médium (angl. *Terrific Broth*, 1000 ml) – 24 g kvasničný extrakt, 20 g trypton, 4 ml glycerol, 17mM KH₂PO₄, 72mM K₂HPO₄
- Vytvájecí fáze na TLC (500 ml) - 350 ml propan-2-ol; 100 ml H₂O; 50 ml 30% NH₄OH

3.3. Přístrojové vybavení

- Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Biogel P-2, gel pro gelovou permeační chromatografii (Bio-Rad, USA)
- Bruker Avance IIITM HD 400 MHz (Bruker, Velká Británie)
- Centrifugy: Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA), Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA), Sorvall RC 6 Plus Centrifuge (Thermo Scientific, USA)
- Destičky na ELISA – F16 Maxisorp NUNC-Immunomodules (Fisher ThermoScientific, Dánsko)
- HPLC Nexera XR a Prominence (Shimadzu, Japonsko)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)
- pH metr pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR)
- Purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- Sběrač Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)
- Aparatura na SDS-PAGE elektroforézu (Bio-Rad, USA)
- Sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- Spektrofotometr UV-1700 Pharma SPec UV-ViS (Shimadzu, Německo)
- Termomixér Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schoeller, Česká republika)
- UV lampa, UV 240 (A. KrüssOptronik, Německo)
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Vakuová filtrace (Milford, MA 01757, USA)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

3.4. Produkce β -galaktosidasy

3.4.1. Transformace plasmidu do *E. coli*

Připravený roztok LBA byl zahříván, dokud se agar nerozpustil. Poté byl sterilně přidán ampicilin (100 mg ml^{-1}) a agar byl rozlit do Petriho misek ve vrstvě cca 1 cm. Misky byly ponechány v laminárním boxu ke ztuhnutí.

Mezitím byla na ledu pomalu rozmrazována kryokonzervovaná kultura kompetentních buněk *E. coli* BL21 Gold DE3 ($100 \mu\text{l}$). Stejným způsobem byl pomalu rozmrazován zásobní roztok plasmidu obsahující gen pro expresi β -galaktosidasy s N-terminální histidinovou kotvou. Náš konstrukt byl ve vektoru pET-DUETTM-1 s restrikčními místy *Bam*HI až *Pst*I, který byl poskytnut v rámci spolupráce s prof. L. Ellingem z univerzity RWTH v Cáchách, Německo. Po rozmražení byl sterilně odebrán $1 \mu\text{l}$ plasmidu, přidán do buněčné suspenze a jemně propipetován. Tato směs byla inkubována na ledu po dobu 2 min a po této době byla směs dána do termomixéru o teplotě $42 \text{ }^\circ\text{C}$ (regenerace buněk). Po uplynutí 45 s byla směs přesunuta zpět na led, což způsobilo tepelný šok. Po 2 min bylo sterilně přidáno $100 \mu\text{l}$ LB média a inkubováno při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 300 ot./min v termomixéru po dobu 1 hod.

Po regeneraci buněk byla směs centrifugována (10 s ; $17\,200 \times g$), vrchní část supernatantu byla odebrána a spodní část byla po resuspendování buněčného peletu naočkována na připravenou misku (50 ml) a ponechána v inkubátoru na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc.

3.4.2. Kultivace *E. coli*

Druhý den byly připraveny tři sterilní 500 ml Erlenmayerovy baňky se 60 ml LB média s přidáním ampicilinem (100 mg ml^{-1}). Postupně byla do každého média zaočkována právě jedna kolonie a prekultury byly inkubovány cca 17 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 220 ot./min .

Následující den byly připraveny tři třílitrové Erlenmayerovy baňky s 600 ml TB média, do kterých byl přidán ampicilin (100 mg ml^{-1}). Do těchto tří baněk byly

přelity prekultury a hlavní kultury opět inkubovány při 37 °C a 140 ot./min do chvíle, kdy optická densita kultury při 600 nm nabyla hodnot mezi 0,6-0,8. Po dosažení této hodnoty bylo přidáno do každé baňky 600 µl IPTG pro indukci proteinové exprese a baňky byly inkubovány při 25 °C a 120 ot./min 18 hodin.

3.4.3. Zpracování biomasy

Buněčné kultury byly centrifugovány při 4500 × g a 8 °C po dobu 20 min. Buněčný pelet byl kvantitativně převeden do 50ml centrifugační zkumavky a doplněn vychlazeným ekvilibračním pufrem na objem 15 ml. Do falkony byl přidán PMSF (500 µl) jako inhibitor proteas. Pelet byl na ledu resuspendován a sonikován šesti cykly po 1 min s 2-minutovou pauzou (amplituda 52 %). Mezi každými dvěma cykly byla směs promíchána. Po sonikaci byl obsah centrifugační zkumavky rozpipetován do 2ml mikrozkušavek a centrifugován při 17 200 × g po dobu 20 min a teplotě 8 °C. Supernatant byl přelit do nové centrifugační zkumavky a doplněn na objem 50 ml. Naředěný supernatant byl přefiltrován 0,8 µm filtrem a nanesen na kolonu.

3.4.4. Purifikace β-galaktosidasy afinitní chromatografií

Galaktosidasa nesoucí histidinovou kotvu byla purifikována pomocí metalochelatační afinitní chromatografie na koloně HisTrap™ (5 ml; GE Healthcare) obsahující navázané nikelnaté ionty na bázi sefarysy.

Před nanesením vzorku byla chromatografická sestava Äkta Prime Plus promyta programem „wash system“, poté byla nasazena kolona a promyta nejdříve 150 ml filtrované ultračisté vody a následně 150 ml ekvilibračního pufru rychlostí 5 ml min⁻¹. Po promývacích krocích byl nanesen vzorek (1 ml min⁻¹) a kolona byla promývána (2 ml min⁻¹) ekvilibračním pufrem, dokud nebyly vymyty všechny nespecificky vázané proteiny.

Samotná eluce byla zahájena elučním pufrém po důkladném vymytí nespecificky navázaných proteinů. Při eluci byly sbírány frakce do sterilních mikrozkušavek (2 ml) při průtoku 1 ml min⁻¹. Průběh eluce byl analyzován pomocí UV detektoru při 240 nm a následně bylo stanoveno v každé frakci množství proteinů pomocí Bradfordova činidla. Frakce, kde byly koncentrace proteinů nejvyšší, byly spojeny a dialyzovány 17 hod v 7 l dialyzačního pufru EPBS a následně v 7 l PBS pufru.

Po eluci enzymu byla kolona ještě promyta 150 ml ultračisté vody (5 ml min⁻¹) a poté 150 ml 20% ethanolu, ve kterém je uchovávána.

3.5. Charakterizace β -galaktosidasy

3.5.1. Stanovení čistoty a koncentrace β -galaktosidasy

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou pomocí Bradfordova činidla, založenou na kvantitativní interakci proteinů s barvivem *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Kolorimetrická změna z hnědého roztoku na modrý se spektrofotometricky kvantifikuje při 595 nm. Neznámá koncentrace proteinů se určuje z kalibrační přímky, která byla vytvořena při stejných podmínkách se standardním proteinem hovězím γ -globulinem.

Při stanovování koncentrace proteinů bylo pipetováno 100 μ l vhodně ředěného enzymu a přidán 1 ml Bradfordova činidla. Tato směs byla promíchána a za laboratorní teploty ponechána inkubovat po dobu 15 minut. Poté se změřila absorbance roztoku při 595 nm.

Čistota připraveného enzymu byla ověřena pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Prvním krokem byla příprava 10% gelu, který byl nanesen mezi dvě sklíčka aparatury zhruba 1,5 cm od horního okraje. Gel byl převrstven *n*-butanolem, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Po zatvrdnutí gelu byl odsát *n*-butanol filtračním papírem a po okraj byl nalit zaostřovací gel. Do gelu byl přidán hřebínek a za laboratorní teploty byl gel ponechán ztuhnout.

Během tuhnutí gelu byl připraven vzorek pro elektroforézu, který obsahoval 20-40 mg proteinu, 5× koncentrovaný vzorkový pufr s barvivem a denaturačními činidly (SDS a DTT). SDS napomáhá denaturaci proteinu a také udává proteinům negativní náboj. DTT, podobně jako merkaptoethanol, působí na redukcí disulfidových můstků, a tedy rozbalení proteinu. Takto připravený vzorek byl krátce centrifugován v mikrocentrifuze a poté byl denaturován při 99 °C po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly nanášeny automatickou pipetou do jamek SDS gelu, který byl umístěný do aparatury pro vertikální elektroforézu s elektrodovým pufrem. Do první jamky byl nanášen nízkomolekulární marker LMW a do dalších jamek analyzované vzorky. Celá aparatura byla přikryta víkem a víko připojeno ke zdroji proudu s nastaveným napětím 130 V. Elektroforéza probíhala, dokud se barvivo nedostalo ke konci gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury do Petriho misky. Gel se nejdříve obarvil roztokem *Coomasie Brilliant Blue* a poté se gel odbarvil na místech, kde nebyly proteiny, odbarvovacím roztokem. Takto odbarvený gel byl uschován v 1% kyselině octové při 4 °C.

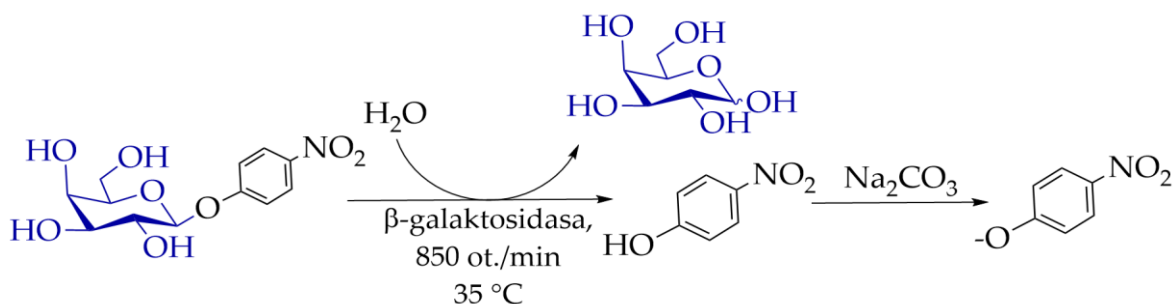
3.5.2. Stanovení aktivity β -galaktosidasy

Hydrolytická aktivita β -galaktosidasy byla stanovena spektrofotometricky. Jako substrát byl použit 10mM zásobní roztok *p*NP-Gal ve vodě. Do mikrozkušavek byl připraven roztok substrátu o koncentraci 2 mmol l⁻¹ v acetátovém pufru a temperován na 35 °C. Přídavkem 10 μ l enzymu byla zahájena reakce, která probíhala 10 minut při 850 ot./min. Po uplynutí této doby byla reakce ukončena přidáním 1 ml 0,1M uhličitanu sodného. Veškerý uvolněný *p*-nitrofenol se po přidání uhličitanu sodného zbarvil žlutě a bylo možné kvantifikovat zbarvení spektrofotometricky při 420 nm (viz Obr. 10).

Měření probíhalo ve třech na sobě nezávislých stanoveních a z průměrných hodnot byla vypočítána aktivita pomocí vztahu 3:

$$AKT = \frac{\overline{ABS} V_c \text{ řed}}{K V_e t} \quad (3)$$

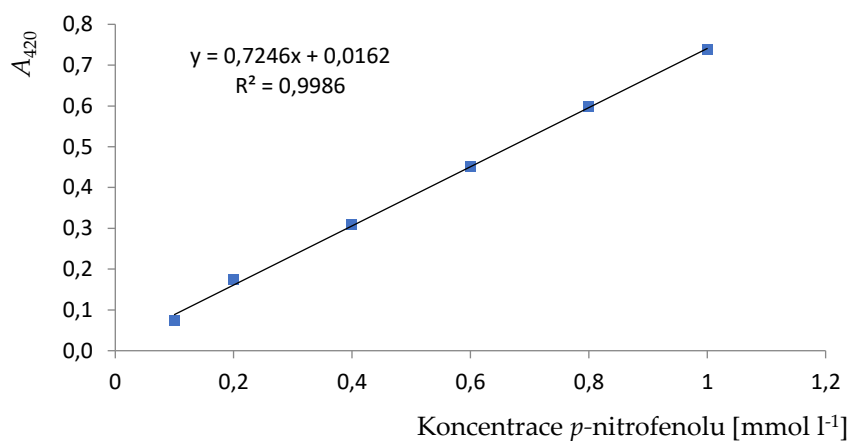
kde AKT označuje objemovou aktivitu [$U \text{ ml}^{-1}$], \overline{ABS} průměr z naměřených absorbancí, V_c celkový objem reakční směsi [μl] (v tomto případě 50 μl), řed ředění enzymu pro stanovení, K konstanta závislosti absorbance p -nitrofenolu na jeho koncentraci vycházející z kalibrační přímky [$l \text{ mmol}^{-1}$] (viz Obr. 11), V_e objem přidaného enzymu [μl] (10 μl) a t reakční doba [min]. 1 U je definována jako takové množství enzymu, které rozštěpí 1 μmol substrátu za minutu za podmínek stanovení.



Obr. 10: Schéma reakce používané ke stanovení hydrolytické aktivity enzymu se substrátem pNP-Gal (vytvořeno v programu ChemDraw Prime). p -Nitrofenol v bazickém prostředí přechází do deprotonované formy, která je barevná.

pH optimum β -galaktosidasy bylo stanoveno v prostředí Britton-Robinsonova pufru, který je univerzální svojí škálou rozmezí hodnot pH 2 až 10. Tento pufr se používal jak v samotné reakční směsi, tak k potřebnému ředění enzymu. I toto stanovení probíhalo při 35 °C, 850 ot./min, ve třech na sobě nezávislých paralelních měřeních. Hodnoty získané z paralelních měření byly zprůměrovány, byl sestaven graf závislosti aktivity enzymu na pH a byla odečtena optimální hodnota pH (v maximu enzymové aktivity).

Teplotní optimum bylo stanoveno ve fosfátovém pufru pH 6,5. Teplotní rozsah, ve kterém se měřilo, byl v rozmezí od 20 °C do 80 °C, kdy se enzym inaktivoval. Teplota byla zvyšována po 5 °C. Měření probíhalo ve třech na sobě nezávislých paralelních stanoveních, jejichž průměry byly vyneseny do grafu v závislosti na teplotě stanovení. Byla odečtena hodnota teplotního optima enzymu, v maximální hodnotě enzymové aktivity.



Obr. 11: Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci p-nitrofenolu pro stanovení enzymové aktivity. Lineární regrese byla proložena přímka s rovnicí $A_{420} = 0,7246 \times c(\text{pNP})$ se stanovenou konstantou úměrnosti $K = 0,7246$.

3.5.3. Stanovení kinetických parametrů β -galaktosidasy

Měření kinetických vlastností enzymu probíhalo kontinuální metodou na UV-1700 Pharma Spec spektrofotometru Shimadzu. Tento přístroj disponuje dvěma držáky na kyvety, kdy se jedna používá jako referenční a druhá jako měrná. Do jedné se připravil referenční vzorek obsahující pouze pufr. Do druhé se připravil roztok pufru a substrátu o dané koncentraci v rozmezí od 0,005 do 0,11 mmol l⁻¹. Reakce byla zahájena přidáním enzymu a rychlým promícháním pipetou. Ihned po promíchání byla kyveta vložena do spektrofotometru a byla měřena závislost změny absorbance při 348 nm na čase po dobu 90 s. Stanovení bylo prováděno ve třech na sobě nezávislých měřeních. Získané hodnoty počátečních rychlostí reakce byly vyneseny do grafu závislosti na výchozí koncentraci substrátu a kinetické

parametry K_M [mmol l⁻¹] a V_{max} [mmol l⁻¹ min⁻¹] byly získány nelineární regresí v programu GraphPad 7.0. Pro výpočet počátečních rychlostí enzymových reakcí pro danou koncentraci substrátu byl využit koeficient $\Delta\epsilon_{348}$ o hodnotě 5,3327 l mmol⁻¹ cm⁻¹, vycházející ze vztahu 4:

$$\Delta\epsilon_{348} = \epsilon_{348,p\text{-nitrofenolu}} - \epsilon_{348,p\text{NP-Gal}} \quad (4)$$

3.6. Enzymová syntéza sacharidů

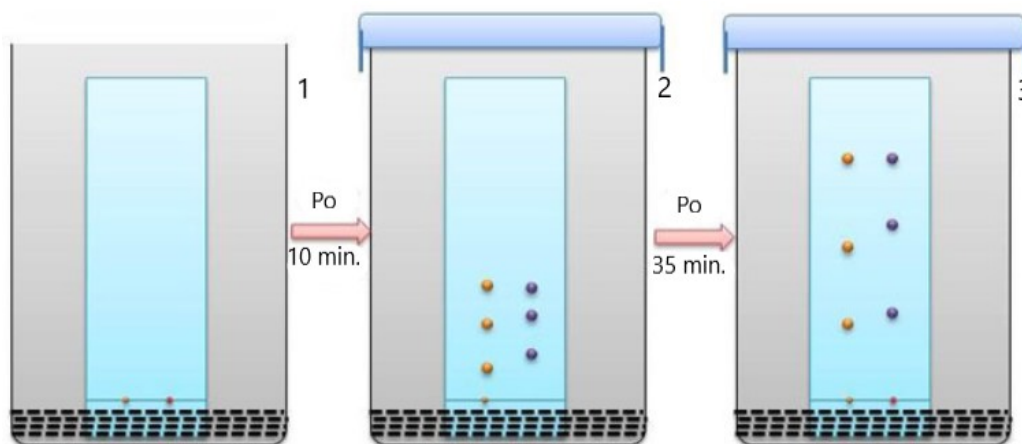
3.6.1. Metody analýzy sacharidů a průběhu jejich syntézy

Nejčastěji využívaná analytická metoda při syntéze sacharidů je chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Tato metoda je založená na rozdílné afinitě látek ke stacionární a mobilní fázi. Její výhodou je především nenáročnost na materiál a provedení. Sloučeniny vzlínají s mobilní fází na povrchu stacionární fáze. Separace molekul probíhá na základě jejich polaritě a velikosti. Proto lze měnit polaritu mobilní fáze za účelem změny retenčního faktoru. Podle poměru vzdálenosti, kterou urazil vzorek od startu, a vzdálenosti mezi čelem destičky a startem se stanovuje retenční faktor dle vztahu (5):

$$R_f = \frac{\text{uražená vzdálenost vzorku od startu}}{\text{uražená vzdálenost čela mobilní fáze od startu}} \quad (3)$$

Vzorky byly nanášeny skleněnou kapilárou o malém objemu (5 μ l) na komerční hliníkové plíšky potažené vrstvou silikagelu. Destička byla vložena do vyvíjecí komůrky s mobilní fází a ponechána inkubovat, dokud mobilní fáze nevzlínala až ke konci destičky. Poté byla destička vysušena, analyzována pod UV lampou pro detekci případných UV-aktivních látek. Následně byla destička ponořena do 5% roztoku kyseliny sírové v ethanolu a rozdělené vzorky byly

karbonizovány horkovzdušnou pistolí.



Obr. 12: Schéma tenkovrstvé chromatografie (převzato a upraveno z [80]). 1- vyvíjecí cela s mobilní fází, do které je vložena destička; 2- uzavřená vyvíjecí komůrka se vztlínajícími vzorky; 3- rozdělené vzorky na destičce

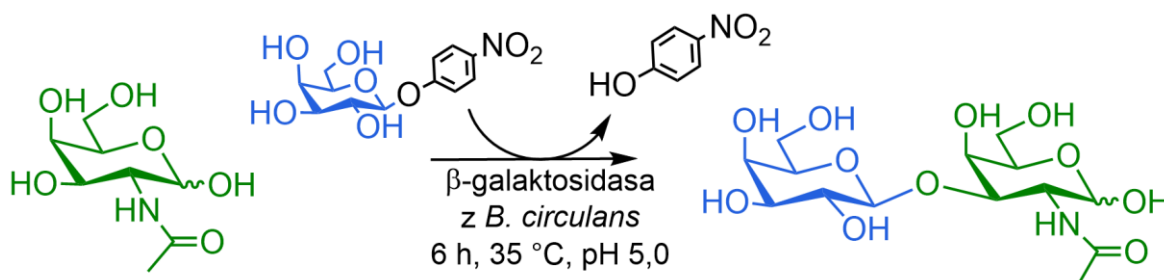
Druhou analytickou metodou užívanou v této práci je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Základem je unášení vzorku mobilní fází a rozdílná distribuce látek mezi mobilní a stacionární fází. Produkty byly separovány na HPLC systému firmy Shimadzu za použití gradientové hydrofilní interakční chromatografie (angl. „*hydrophilic interaction liquid chromatography*“, HILIC). Jedná se o silikagelovou kolonu s navázanými karbamoylovými zbytky. Jako mobilní fáze byla použita fáze acetonitril/voda (gradient 0-7 min 78/22, 8-20 min 65/35, 21-25 min 65/35, 26-35 min 78/22).

Třetí metodou využitou v této práci byla nukleární magnetická rezonance (NMR spektroskopie). Jedná se o analytickou metodu, která je založena na absorpci radiofrekvenčního záření vzorkem umístěným v silném magnetickém poli poskytující informaci o struktuře zkoumané látky. Působením magnetického pole na jaderné spiny způsobí jejich rozštěpení na dvě energetické hladiny. Čím je vnější magnetické pole silnější, tím bude i větší štěpení. Pokud takto rozštěpený systém ozáříme radiofrekvenčním zářením, dochází k excitaci spinů z nižší energetické hladiny do hladiny vyšší. Následně dochází k měřitelné deexcitaci [81]. Využívá se jak k analýze struktury nízkomolekulárních látek, tak i k objasnění interakcí větších molekul, např. bílkovin.

3.6.2. Příprava TF antigenu

Pro přípravu TF antigenu (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc) v analytickém měřítku byl použit *p*NP-Gal (30 mmol l⁻¹) jako donor a GalNAc (300 mmol l⁻¹) jako akceptor. Reakční směs byla připravena v 50mmol/l acetátovém pufru pH 5 nebo ve fosforečnanovém pufru pH 7,5 s 20% nebo 40% acetonitrilem pro porovnání kvantity produktů vznikajících v rozdílném pH. Reakce byla katalyzována β -galaktosidasou *BgaC* v množství 0,04-0,10 U. Celkový objem analytické reakce činil 200 μ l.

Pro preparativní reakci bylo naváženo 4 \times 9 mg *p*NP-Gal a 4 \times 66,4 mg GalNAc do 1,5ml mikrozkuvek. Poté bylo přidáno 4 \times 741 μ l acetátového pufru pH 5 a 254 μ l acetonitrilu, který celkově tvořil 20 obj. % reakce. Mikrozkuvky se nechaly několik minut za stálého míchání v termomixéru vytemperovat na 35 $^{\circ}$ C. Pak bylo přidáno 4 \times 0,15 U enzymu, čímž byla reakce zahájena, a termomixér byl nastaven na 850 ot./min. Reakční směs byla v pravidelných intervalech analyzována pomocí tenkovrstvé chromatografie, až do téměř úplné konverze donoru, kdy byla reakce zastavena inaktivací enzymu při 99 $^{\circ}$ C po dobu 3 minut. Reakční doba se pohybovala okolo 6 hodin. Po ukončení reakce byly mikrozkuvky centrifugovány při 17 200 \times g po dobu 10 min. Na dně mikrozkuvek zůstal po centrifugaci denaturovaný enzym a supernatant byl odebrán do baňky. Mikrozkuvky byly ještě promyty 100 μ l destilované vody, opět centrifugovány a supernatanty byly spojeny. Spojené supernatanty byly naneseny na připravenou kolonu gelové permeační chromatografie Biogel P-2 v ultračisté vodě jako mobilní fázi o průtoku 7,6 ml/hod. Nanesený vzorek byl ještě třikrát převrstven mobilní fází.

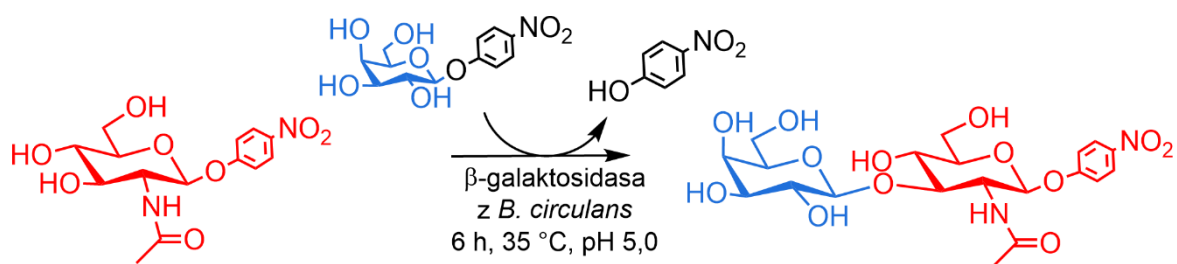


Obr. 13: Reakční schéma přípravy TF antigenu (vytvořeno v programu ChemDraw). Transglykosylace s donorem *p*NP-Gal a akceptorem GalNAc za katalýzy β -galaktosidasou z *Bacillus circulans*.

Byly sbírány frakce o objemu 2 ml a analyzovány pomocí TLC společně s reakční směsí pro porovnání. Frakce, které obsahovaly náš produkt bez nečistot, byly slity a lyofilizovány. Po lyofilizaci byly produkty analyzovány pomocí HPLC a NMR.

3.6.3. Příprava disacharidu *p*NP-LacNAc typ 1

Postup pro přípravu disacharidu *p*NP-LacNAc typ 1 (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-*p*NP) byl obdobný jako při přípravě TF antigenu. Nejprve se vyzkoušela příprava v analytickém měřítku. Jako donor v této reakci byl použit *p*NP-Gal (30 mmol l⁻¹) a akceptor *p*NP-GlcNAc (50 mmol l⁻¹). Reakce byla opět testována v acetátovém pufru pH 5 i ve fosforečnanovém pufru pH 7,5. V obou směsích byl přítomen 20% acetonitril. Reakce byly katalyzovány enzymem (0,15-0,30 U).



Obr. 14: Reakční schéma přípravy *p*NP-LacNAc typ 1 (vytvořeno v programu ChemDraw).
Transglykosylace *p*NP-Gal na akceptor *p*NP-GlcNAc za katalýzy β -galaktosidasou z *Bacillus circulans*.

Pro preparativní reakci bylo připraveno 4 \times 9 mg *p*NP-Gal a 4 \times 17,1 mg *p*NP-GlcNAc do mikrozkušavek. Do mikrozkušavek byl přidán acetátový pufr pH 5 (741 μ l) a acetonitril (254 μ l) o výsledné objemové koncentraci 20 obj. %. Mikrozkušavky byly vloženy do termomixéru a temperovány na 35 °C. Pak byl do směsi přidán enzym (1,5 U) a termomixér byl nastaven na 850 ot./min. Průběh konverze byl kontrolován přibližně každou hodinu pomocí TLC. Přibližně po 6 hodinách, kdy donor z reakce téměř vymizel, byla reakce zastavena inaktivací enzymu při 99 °C po dobu 3 minut. Po inaktivaci enzymu byly mikrozkušavky

centrifugovány 10 minut při $17\,200 \times g$. Supernatant byl přenesen do baňky, obsah mikrozkmavek byl propláchnut 100 μl vody, po centrifugaci byly všechny supernatanty spojeny, nanесeny na gelovou kolonu a převrstveny ultračistou vodou, která byla zároveň mobilní fází. Při průtoku $7,6 \text{ ml min}^{-1}$ měla každá frakce objem asi 2 ml. Frakce byly následně analyzovány pomocí TLC. Ty, které obsahovaly čistý produkt, byly spojeny a lyofilizovány.

3.7. Stanovení afinity disacharidů pomocí kompetitivní metody ELISA

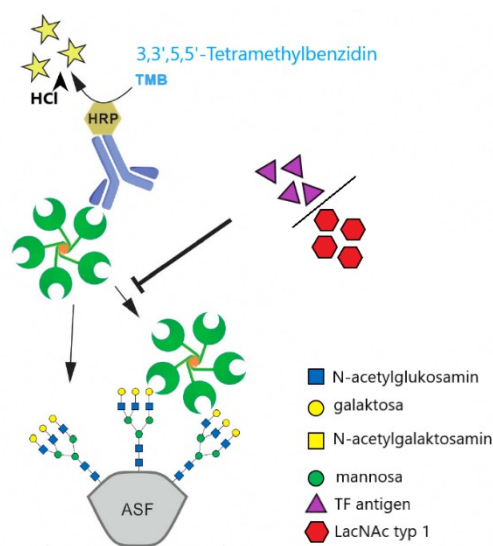
U připravených sacharidových ligandů byla stanovena afinita ke Gal-1 a Gal-3 pomocí kompetitivní metody ELISA.

Galektiny byly připraveny rekombinantní expresí a purifikovány dle standardního postupu dle Tavares *et al.* [82]. Purifikace probíhala pomocí metalochelatační afinitní chromatografie na koloně HisTrap™ (5 ml, GE Healthcare). Galektiny s histidinovou kotvou byly eluovány elučním pufrém obsahujícím 250 mM imidazol. Výsledné frakce obsahující galektin byly spojeny a dialyzovány přes noc v 7 EPBS pufru. Výsledný protein byl filtrován a skladován při 4 °C. Produkce a následná purifikace byla totožná pro Gal-1 i Gal-3.

Pro stanovení ELISA byla první den experimentu připravena 96-jamková mikrotitrační destička a na dno jamek bylo multikanálovou pipetou pipetováno do každé jamky 50 μl 0,1 $\mu\text{mol/l}$ roztoku asialofetuinu (ASF) v PBS pufru. Destička byla přikryta plastovým krytem a ponechána inkubovat přes noc při laboratorní teplotě. ASF se používá jako standardní imobilizovaný kompetitor pro vázání galektinů. Jedná se o multivalentní glykoprotein prezentující tři triantenární N-glykany zakončené LacNAc [83].

Druhý den experiment byly potřebné roztoky temperovány na laboratorní teplotu. Pak byla destička promyta $3 \times 250 \mu\text{l}$ PBST pufrém pro odstranění nenavázaného ASF. Poté byla jamka blokována roztokem 2% hovězího sérového albuminu (BSA) v PBS pufru po dobu 1 hodiny. Zatím byly připraveny roztoky

inhibitorů a 20 $\mu\text{mol/l}$ zásobní roztoky Gal-1 a Gal-3. Po blokování byla jamka znovu promyta 3 \times 250 μl PBST pufru a následně byly pipetovány vzorky o různých koncentracích inhibitoru v objemu 25 μl do jednotlivých jamek. Po nanesení všech vzorků bylo do všech jamek přidáno 25 μl Gal-1 nebo Gal-3 a jamky byly promíchány poklepáním. Vzorky byly inkubovány dvě hodiny při laboratorní teplotě, po inkubaci byly jamky znovu promyty 3 \times 250 μl PBST pufru a navázaný galektin byl označen 50 μl myší protilátky proti histidinové kotvě (Anti-His₆-peroxidasa, ředění 1:1000) konjugované s křenovou peroxidasou. Po hodinové inkubaci byly jamky promyty 3 \times 250 μl PBST pufru a destička byla přenesena do temné místnosti. Zde byl přidán fotosenzitivní substrát TMB One (50 μl) pro konjugovanou peroxidasu, a zahájila se tak tvorba barevného produktu. Po zabarvení reakčních směsí v jamkách odpovídající absorbanci cca 1,0 byla reakce zastavena přidáním 50 μl 3 mol/l HCl. Kolorimetrická reakce byla kvantifikována při 450 nm na přístroji Magellan Sunrise. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny nelineární regresí programem GraphPad Prism, kde se vynášela závislost absorbance na logaritmu koncentrace testovaných ligandů – inhibitorů a byla získána hodnota IC₅₀.

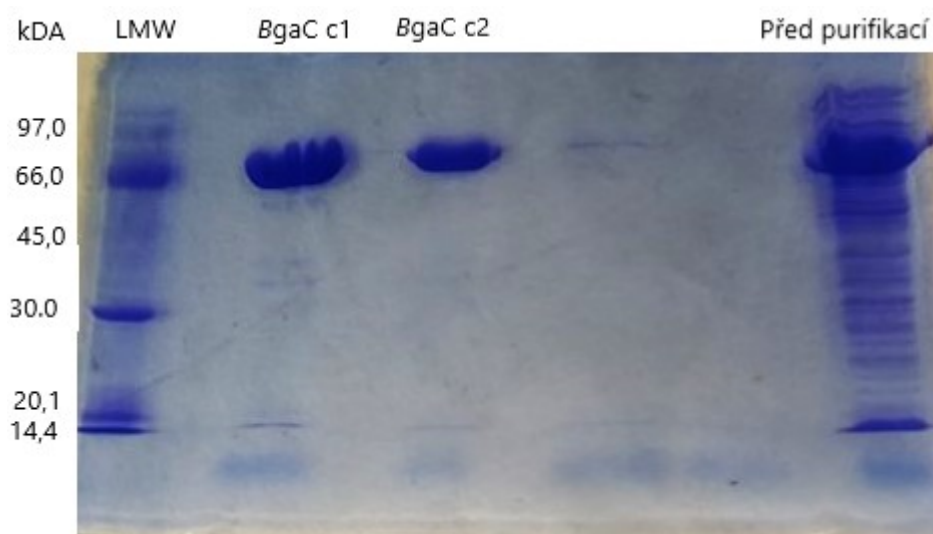


Obr. 15: Schéma kompetitivní ELISA metody (převzato a upraveno z [83]). Připravené produkty (TF antigen a LacNAc typ1) soutěží o vazebné místo na galektinu s imobilizovaným ASF. **HRP** - horseradish peroxidase, křenová peroxidasa konjugovaná na protilátce Anti-His₆; **TMB** - 3,3,5,5-tetramethylbenzidin, substrát, který se po oxidaci změní na barevný produkt

4. Výsledky

4.1. Produkce a purifikace β -galaktosidasy v *E. coli*

Plasmid nesoucí gen β -galaktosidasy z *Bacillus circulans* BgaC byl získán ze spolupracujícího pracoviště prof. L. Ellinga, RWTH Cáchy, Německo. Tento plasmid byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL21 GOLD DE3. Exprese β -galaktosidasy byla indukována přidavkem IPTG. Purifikace enzymu probíhala pomocí afinitní chromatografie na HisTrap koloně, na bázi sefaryzy nesoucí Ni^{2+} ionty, na něž se enzym s histidinovou kotvou specificky váže, s elucí vysokou koncentrací imidazolu. Imidazol byl z roztoku purifikovaného enzymu odstraněn pomocí dialýzy. Pokud je sterilně přefiltrován, enzym je několik měsíců stabilní při 4 °C.



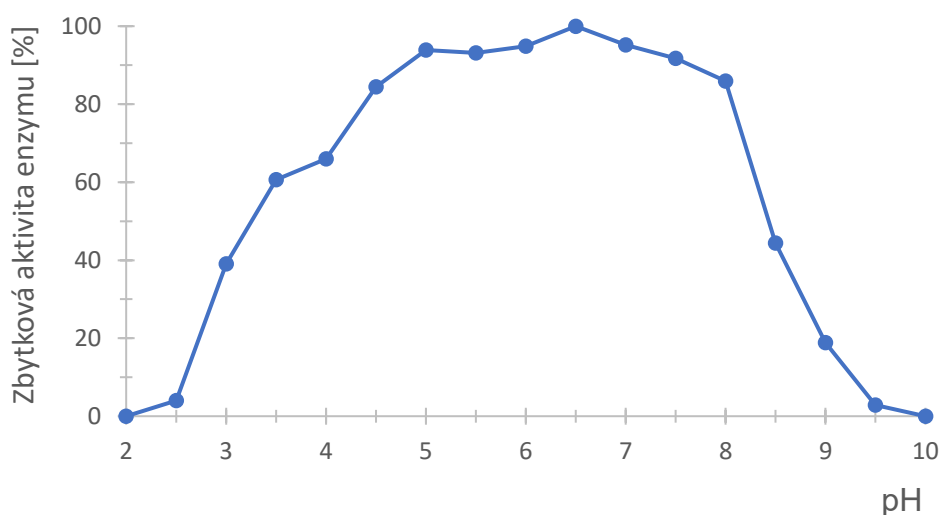
Obr. 16: SDS-PAGE gel průběhu purifikace enzymu BgaC. LMW-marker „low molecular weight“; BgaC c1 – enzym BgaC o koncentraci 10,8 mg ml⁻¹; BgaC c2 – enzym BgaC o koncentraci 5,4 mg ml⁻¹; Před purifikací – buněčný extrakt před nanesením na kolonu.

Buňky mohly být s výhodou před purifikací přes noc zmrazeny. Došlo tak k dokonalejšímu rozrušení buněčné stěny a bylo možné zvýšit produkci enzymu až o 20%. Molekulová hmotnost enzymu BgaC je 66,8 kDa, což bylo potvrzeno i SDS elektroforézou dle LMW markeru. Na produkci bylo použito 1 g buněk ze 100 ml

média a bylo získáno 134 mg enzyme o specifické aktivitě 1,2 U/mg.

4.2. Biochemická charakterizace β -galaktosidasy

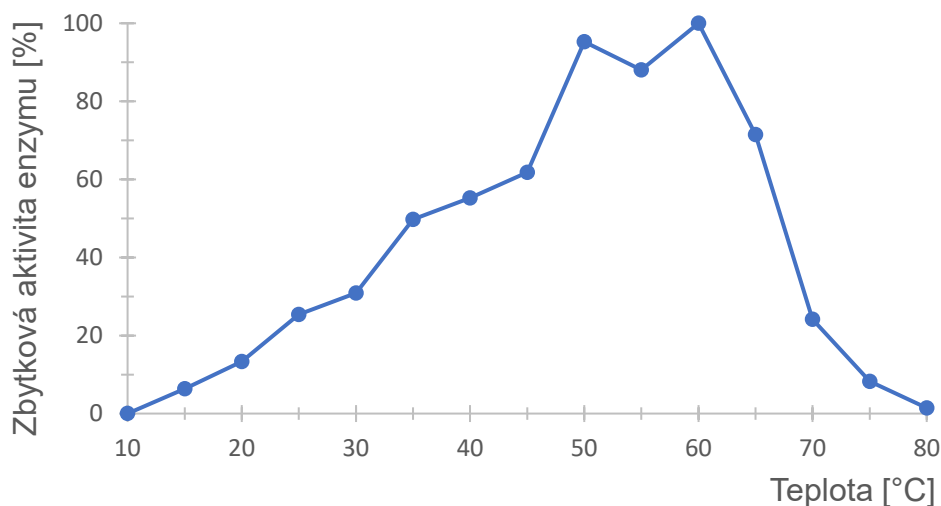
pH optimum β -galaktosidasy BgaC bylo stanovováno diskontinuální metodou v prostředí univerzálního Britton-Robinsonova pufru v rozsahu hodnot pH 2-9,5. Jako substrát byl použit chromogenní substrát *p*-nitrofenyl- β -D-galaktosid (*p*NP-Gal). Z průměrných hodnot byl sestaven graf závislosti zbytkové aktivity enzymu v procentech na pH. Z grafu (viz obr. 17) byla odečtena hodnota pH optima enzyme při pH 6,5.



Obr. 17: Závislost zbytkové aktivity enzymu BgaC na pH.

Teplotní optimum enzymu bylo měřeno s tímž substrátem ve fosforečnanový pufru pH 6,5 (tj. v hodnotě pH optima) v rozmezí od 10 °C do 85 °C. Při každé teplotě byla provedena tři nezávislá měření hydrolytické aktivity enzymu a z jejich průměrných hodnot byl sestaven graf (viz obr.18) závislosti procentuální zbytkové aktivity enzymu na teplotě. Z grafu je patrné, že nejvyšší hydrolytická aktivita enzymu byla při 60 °C. To je klasický profil závislosti aktivity na teplotě nalézáný u glykosidas [84]. Experimentálně tato teplota není vhodná pro transglykosylační reakce, jak bude rozepsáno v další kapitole, jelikož se jedná o teplotu optimální pro maximální hydrolýzu a nikoliv pro transglykosylaci. Dalším

důvodem je nestabilita enzymu při této teplotě po delší dobu než jedné hodiny [84]. V praxi by to znamenalo, že při transglykosylačních reakcích, které většinou trvají okolo 5 hodin, by se enzym v první části reakce teplotou prakticky inaktivoval.



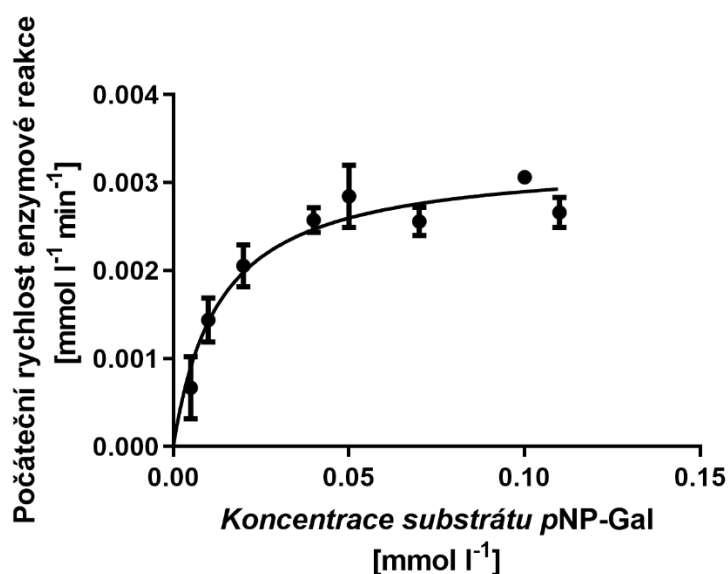
Obr. 18: Závislost zbytkové aktivity enzymu BgaC na teplotě.

Posledním stanovovaným biochemickým parametrem β -galaktosidasy BgaC bylo stanovení kinetických parametrů. Pro toto měření byl opět použit standardní substrát *p*NP-Gal v rozmezí koncentrací od 0,005 do 0,11 mmol l⁻¹.

Měření bylo prováděno kontinuální metodou při vlnové délce 348 nm. Při této vlnové délce má *p*-nitrofenol isosbestický bod, což je vlnová délka, kdy má *p*-nitrofenol a jeho ionizovaná forma (fenolát) stejný extinkční koeficient a nachází se v průsečíku obou spekter. Při této vlnové délce je však nutno vzít v úvahu i nezanedbatelnou absorbanci samotného substrátu *p*NP-Gal, což snižuje citlivost stanovení a umožňuje měřit pouze v nižším rozsahu koncentrací substrátu. Kontinuální měření aktivity je proto vhodné pouze pro enzymy s nízkou hodnotou K_M . Z naměřených hodnot byl zpracován graf závislosti počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu (viz Obr. 17)

Vyhodnocení této závislosti bylo provedeno nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism a byly stanoveny kinetické parametry:

$K_m = 13 \pm 2 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $k_{\text{cat}} = 0,84 \pm 0,038 \text{ s}^{-1}$. Katalytická účinnost enzymu, která se definuje jako poměr k_{cat}/K_M , byla $64,1 \text{ l mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



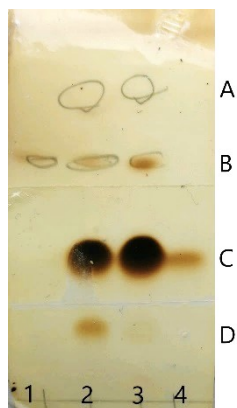
Obr. 19: Závislost počáteční rychlosti hydrolýzy substrátu pNP-Gal β -galaktosidasou BgaC na koncentraci substrátu.

4.3. Transglykosylační reakce

4.3.1. Příprava TF antigenu

Optimalizace podmínek pro regioselektivní syntézu TF antigenu (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc) probíhala ve dvou různých pH (5 a 6,5) a dvou různých koncentracích acetonitrilu jako kosolventu (20 % a 40 obj. %). Acetonitril se do transglykosylačních reakcí s glykosidasami často přidává pro snížení aktivity vody a zvýšení transglykosylační aktivity enzymu [85,86]. Po rozpuštění donoru pNP-Gal a akceptoru GalNAc ve směsi pufru a kosolventu a přidání enzymu byla sledována reakční konverze a vznik produktu pomocí TLC. Reakce obsahující větší množství acetonitrilu probíhaly pomaleji a měly nižší konverzi. Pro syntézu TF

antigenu bylo proto zvoleno pH 5, protože reakce dosahovala větší konverze než pH 6,5, a spotřebovalo se tedy méně enzymu.

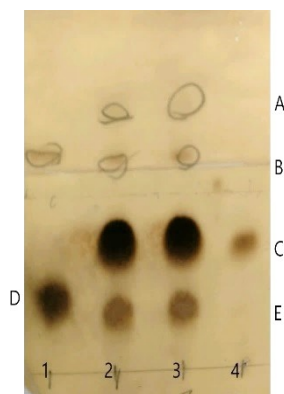


Obr. 20: Srovnání průběhu syntézy TF antigenu za katalýzy enzymem BgaC v pH 5 a pH 6,5 po 4 hodinách. 1-donor pNP-Gal; 2- reakční směs při pH 5; 3- reakční směs při pH 6,5; 4- akceptor GalNAc; A- p-nitrofenol; B - pNP-Gal; C- GalNAc; D- vznikající produkt TF antigen

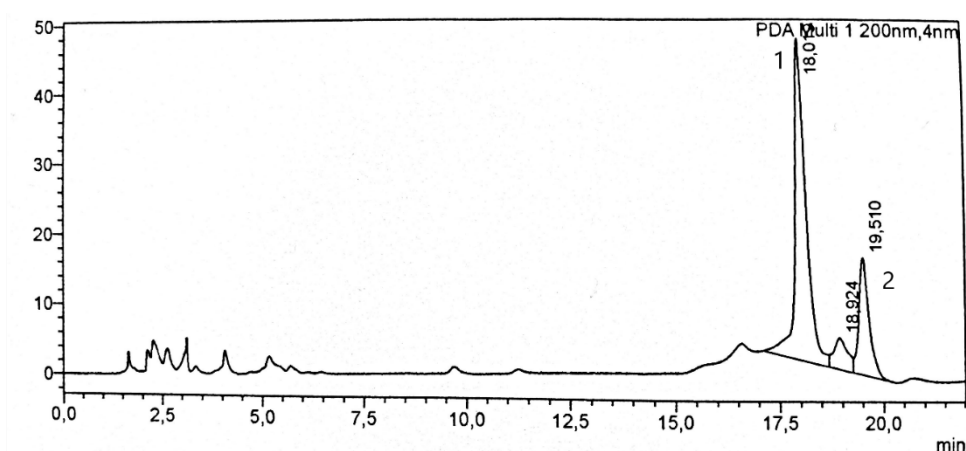
Jako vhodné množství enzymu v preparativní reakci o objemu 1000 μ l bylo stanoveno množství odpovídající aktivitě 0,05 U. Reakce s menším množstvím enzymu trvaly déle než 8 hodin, na druhou stranu s větším množstvím enzymu trvaly pouhou 1 hodinu a převažoval vznik hydrolytického produktu.

Po ukončení preparativní reakce byl produkt purifikován gelovou permeační chromatografií (Biogel P-2) a čistý produkt byl lyofilizován.

Bylo připraveno 10 mg TF antigenu (22 %). Čistota 92 % stanovena pomocí HPLC (viz Obr. 20). Pro toto stanovení byla použita metoda hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) s gradientovou elucí. Struktura produktu byla potvrzena NMR (Příloha 1).



Obr. 21: Průběh syntézy TF Antigenu v pH 5 po 5 hodinách. 1- donor pNP-Gal + galaktosa; 2- reakční směs; 3- reakční směs; 4- akceptor GalNAc; A- p-nitrofenol; B- pNP-Gal; C- GalNAc; D- laktosa; E- vznikající produkt TF antigen.



Obr. 22: HPLC chromatogram purifikovaného TF antigenu-čistota 92 %. (kolona HILIC, detekce při 200 nm, 25 °C, průtok 1 ml min⁻¹, acetonitril/voda); 1-β-D-Gal-(1→3)-D-GalNAc; 2- α-D-Gal-(1→3)-D-GalNAc

4.3.2. Příprava disacharidu pNP-LacNAc typ 1

K optimalizaci podmínek pro syntézu funkcionalizovaného disacharidu pNP-LacNAc typ 1 (β-D-Gal-(1→3)-D-GlcNAc-(1→O)-pNP) byl použit donor pNP-Gal a akceptor pNP-GlcNAc. V analytických transglykosylačních reakcích byly testovány rozdílné koncentrace acetonitrilu (20 a 40 obj. %), různé hodnoty pH (5 a 6,5) a různé množství enzymu (0,75-1,5 U/ml). Konverze byla analyzována pomocí TLC. Reakce se 40 obj. % acetonitrilu vykazovaly mnohem nižší výtěžky než se 20 obj. % acetonitrilu. Proto byly jako optimální pro tuto transglykosylační reakci zvolen obsah acetonitrilu 20 obj. % a pH 5, jak tomu bylo i při syntéze TF (viz Obr. 21). Množství enzymu v preparativní reakci o objemu 1000 μl bylo zvoleno 1,5 U/ml.

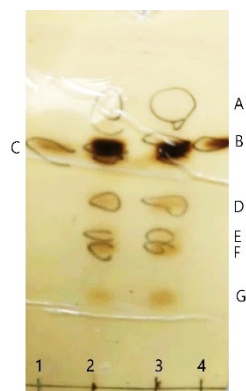
Reakce s menším množstvím enzymu neposkytovaly dostatečnou konverzi a transglykosylace byla příliš pomalá.



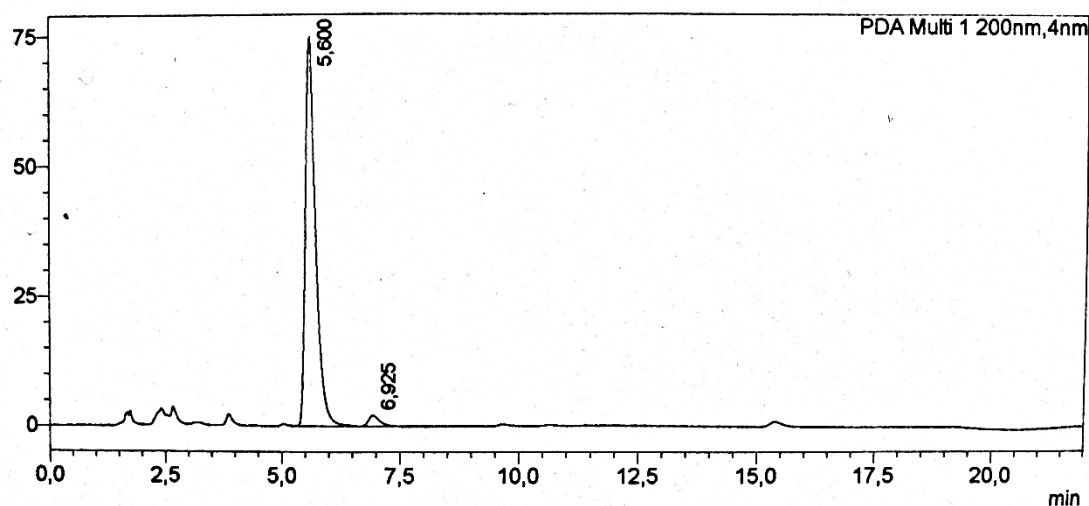
Obr. 23: Srovnání průběhu syntézy pNP-LacNAc typ 1 v pH 5 a pH 6,5 po 5 hodinách. 1- donor pNP-Gal; 2- reakční směs při pH 5; 3- reakční směs při pH 6,5; 4- akceptor pNP-GlcNAc; A- p-nitrofenol; B- pNP-GlcNAc; C- pNP-Gal; D- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP; E- regioizomer β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP; F- vedlejší produkt β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal-(1 \rightarrow O)-pNP

Po úplné konverzi donoru byla preparativní reakce zastavena a produkty reakce byly purifikovány gelovou permeační chromatografií (Biogel P-2). Čistý β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP byl lyofilizován. Vedlejší produkty reakce β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP a β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow O)-pNP byly analyzovány pomocí HPLC, ale dále neizolovány, neboť nebyly eluovány v dostatečné čistotě. Jejich struktura byla odhadnuta porovnáním s autentickými standardy metodou HPLC.

V preparativní transglykosylační reakci bylo připraveno 8 mg produktu β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP (výtěžek 15%). Čistota izolovaného produktu 97 % byla stanovena pomocí HPLC (viz Obr. 23). Struktura byla potvrzena NMR spektroskopií (Příloha 2).



Obr. 24: Průběh syntézy LacNAc-O-pNP typ 1 po 6 hodinách. 1- standard donoru pNPGal; 2- reakční směs při pH 5; 3- reakční směs při pH 6,5; 4- standard akceptoru pNPGlcNAc; A- p-nitrofenol; B- pNP-GlcNAc; C- pNP-Gal; D- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP; E- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-pNP; F- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal-(1 \rightarrow O)-pNP



Obr. 25: HPLC chromatogram purifikovaného disacharidu pNP-LacNAc typ 1- čistota 97 %. (kolona HILIC, detekce při 200 nm, 25 °C, průtok 1 ml min⁻¹, acetonitril/voda)

4.4. Vazebná afinita připravených ligandů ke Gal-1 a Gal-3

U obou připravených disacharidových ligandů byla pomocí kompetitivní ELISA metody stanovena vazebná afinita ke Gal-1 a Gal-3. Vazebná afinita byla stanovena jako schopnost inhibovat vazbu galektinu k imobilizovanému standardnímu ligandu asialofetuinu. Výsledkem stanovení byla hodnota IC₅₀, tedy koncentrace ligandu, při které je dosaženo 50% inhibice vazby galektinu na imobilizovaný asialofetuin. Množství zbytkového galektinu navázaného do jamky bylo stanoveno pomocí komerční protilátky proti histidinové kotvě konjugované s

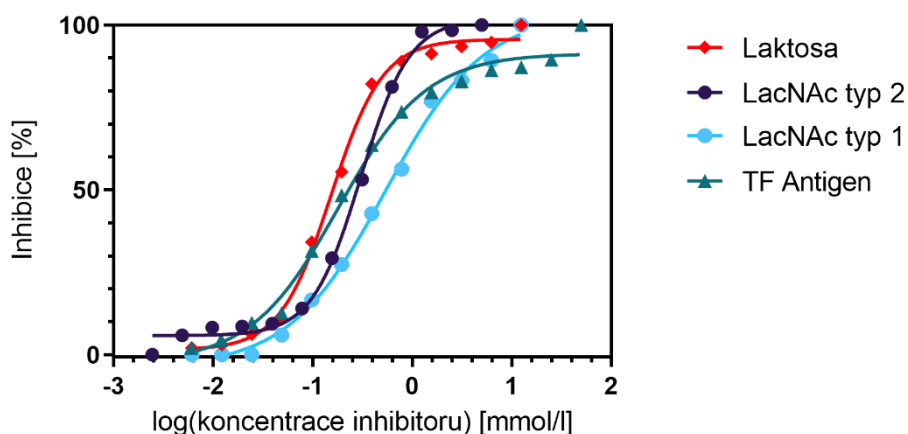
křenovou peroxidasou. Po přidání chromogenního substrátu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin bylo zbytkové množství galektinu v jamce měřeno spektrofotometricky při 450 nm. Navázané množství galektinu bylo nepřímo úměrné inhibiční schopnosti testovaného ligandu a jeho koncentraci.

Galektiny s histidinovou kotvou byly připraveny rekombinantní expresí v *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS a následnou purifikací na afinitní chromatografií. Bylo získáno 4,2 g buněk ze 600 ml média obsahující Gal-1, ze kterých bylo získáno 37 mg Gal-1. Na purifikaci Gal-3 bylo použito 4,7 g buněk ze 600 ml média a bylo dosaženo výtěžku 38 mg proteinu.

Připravené disacharidové ligandy byly proměřeny zároveň se dvěma komerčními standardními ligandy, a to laktosou a disacharidem LacNAc typ 2 (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc). Měření proběhlo ve třech nezávislých stanoveních, získaná data byla vyhodnocena nelineární regresí v programu GraphPad Prism a byla odečtena hodnota IC₅₀ (viz Obr. 26,27).

Tab. 1: Inhibiční potenciál (IC₅₀) připravených disacharidových ligandů vůči Gal-1

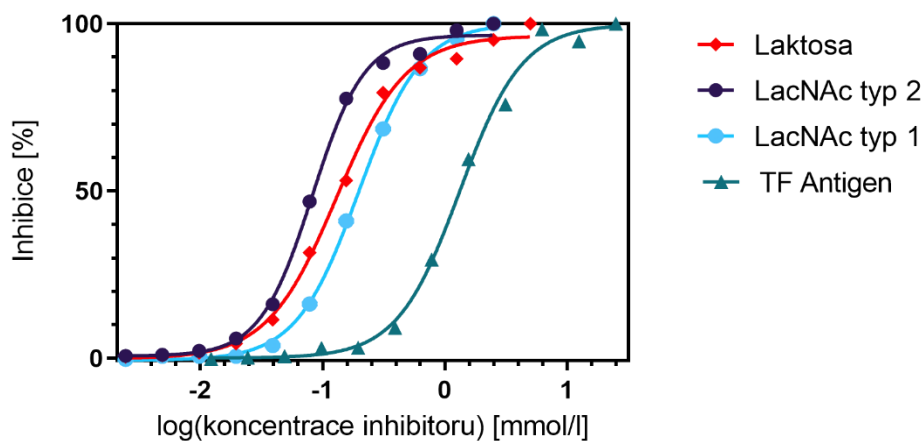
Inhibitor	IC ₅₀ [μ mol l ⁻¹]			průměr	směr. odchylka
	1. paralelka	2. paralelka	3. paralelka		
Laktosa (standard)	244	303	361	303	47,8
LacNAc typ 2 (standard)	50	58	53	54	3,3
pNP-LacNAc typ 1	157	117	169	148	22,2
TF antigen	7061	6653	6600	6771	206,0



Obr. 26: Průběh závislosti míry inhibice vazby Gal-1 na ASF na koncentraci testovaných sacharidových ligandů (vytvořeno v programu GraphPad Prism7.0)

Tab. 2: Inhibiční potenciál (IC₅₀) připravených disacharidových ligandů vůči Gal-3

Inhibitor	IC ₅₀ [μmol l ⁻¹]			průměr	směr. odchylka
	1. paralelka	2. paralelka	3. paralelka		
Laktosa (standard)	141	130	125	132	6,7
LacNAc typ 2 (standard)	31	31	33	32	0,9
LacNAc typ 1	30	40	32	34	4,3
TF antigen	230	340	230	267	51,9



Obr. 27: Průběh závislosti míry inhibice vazby Gal-3 na ASF na koncentraci testovaných sacharidových ligandů (vytvořeno v programu GraphPad Prism7.0)

Z naměřených hodnot vyplývá, že připravený produkt TF antigen je zhruba 25× selektivnější ke Gal-3 než ke Gal-1. Jeho hodnota IC₅₀ při inhibici vazby Gal-1 na ASF je 6771 μmol l⁻¹, zatím co pro Gal-3 je to 267 μmol l⁻¹. pNP-LacNAc typ 1 jeví srovnatelné inhibiční vlastnosti ke Gal-3 jako jeho analog LacNAc typ 2. Při vazbě na Gal-1 má však tento ligand téměř třetinový inhibiční potenciál v porovnání s LacNAc typ 2. Jeho IC₅₀ vypovídá o 3× vyšší selektivě ke Gal-3.

5. Diskuze

β -galaktosidasa je rozšířený enzym, který lze najít jak u mikroorganismů a rostlin, tak u živočichů. Patří do rodiny glykosidas, které štěpí glykosidovou vazbu. Tato vlastnost nachází své využití nejen *in vivo*, ale i *in vitro*. Často se využívá v potravinářském průmyslu při výrobě bezlaktosových potravin [12]. Isoforma BgaC β -galaktosidasy z *Bacillus circulans* je specifická tím, že je dle literatury regioselektivní pro tvorbu glykosidové vazby $\beta(1\rightarrow3)$ [87], což je výjimečné v porovnání s ostatními isoformami galaktosidas izolovaných z tohoto mikroorganismu.

Cílem této práce bylo heterologní expresí připravit β -galaktosidasu BgaC v *E. coli* a charakterizovat ji jak z hlediska biochemických vlastností (pH optimum, teplotní optimum, kinetické parametry), tak z hlediska transglykosylačních schopností. Optimalizací reakčních podmínek jsem připravil dva disacharidy s vazbou $\beta(1\rightarrow3)$, obě látky jsem izoloval gelovou chromatografií a stanovil jejich afinitu ke dvěma proteinům Gal-1 a Gal-3 pomocí kompetitivní ELISA metody.

Enzym BgaC byl produkován heterologní expresí v *E. coli* Gold DE3 z plasmidu, který získalo školicí pracoviště od spolupracujícího pracoviště (Universita RWTH v Cáchách). Konstrukt enzymu nese na N-konci histidinovou kotvu, takže byla k jeho purifikaci využita afinitní chromatografie. Purifikace afinitní chromatografií dosáhla dobrého výtěžku 22 mg proteinu na 100 ml média. Čistota enzymu byla stanovena pomocí SDS-PAGE elektroforézy na více než 95%, což ukazuje na vysokou selektivitu purifikace. K vysoké selektivě vazby na afinitní matici přispěla též přítomnost 20mmol l⁻¹ koncentraci imidazolu v ekvilibračním pufru, což zamezilo nespecifickým vazbám protein na koloně. Purifikovaný enzym byl dlouhodobě stabilní při 8 °C déle než rok Kritická hranice koncentrace pro

uchovávání delší dobu byla 20 mg ml⁻¹; při vyšší koncentraci měl enzym tendenci precipitovat z roztoku za ztráty aktivity.

Biochemická charakterizace zahrnovala zjištění pH a teplotního optima a kinetických parametrů. Zjištěné pH optimum 6,5 je srovnatelné s publikovaným údajem pH 6 [87]. Srovnatelná je i hodnota teplotního optima, které v obou případech vyšlo 60 °C.

Při optimalizaci přípravy disacharidů bylo pH jedním z klíčových faktorů. Zatímco při pH 6,5 (pH optimum) dosahovala hydrolytická aktivita enzymu nejvyšších hodnot, při syntéze prokázala nižší konverzi než při pH 5, kdy má enzym 94 % hydrolytické aktivity v porovnání s pH optimum. Pro potlačení hydrolytické aktivity byla 20 obj. % acetonitrilu stanoveno jako vhodnější než vyšší obsah. Při koncentraci 40 obj. % acetonitrilu nebyla zjištěna vyšší inhibice hydrolytické aktivity ani vyšší selektivita reakce a za stejnou dobu vykazovala reakce mnohem nižší konverzi. Reakce probíhala při teplotě 35 °C. Vyšší teplota by enzym nezdenaturovala, ale podnítila by hydrolýzu na úkor transglykosylační reakce, což by vedlo ke snížení výtěžku.

Byla provedena enzymová syntéza dvou disacharidů: TF antigen a *p*NP-LacNAc typ 1. TF antigen byl připraven v množství 10 mg odpovídající 22 % výtěžku. LacNAc typ 1 byl připraven v množství 8 mg, s 15% výtěžkem. I když výtěžky nedosahují vysokých hodnot z objektivního měřítka, jsou tyto syntézy přesto užitečné, protože jsou časově nenáročné a jednokrokové. Také je nutno podotknout, že syntézy byly katalyzovány enzymem divokého typu. Mutantní varianta, kdy je katalytický nukleofil zaměněn za nenukleofilní zbytek, dosahuje mnohem vyšších výtěžků [2], ale je experimentálně náročnější, neboť využívá méně stabilní glykosyl-fluoridy. Při porovnání výtěžků lze pozorovat vyšší regioselektivitu enzymu, je-li použit akceptor s *galakto*-konfigurací než s *gluko*-konfigurací.

Inhibiční potenciál připravených látek byl měřen pomocí kompetitivního

stanovení ELISA typu. Byla stanovena míra inhibice vazby galektinu na imobilizovaný asialofetuin syntetizovanými ligandy. TF antigen byl potvrzen jako 25× selektivnější ke Gal-3 ($IC_{50} = 267 \mu\text{mol l}^{-1}$) než ke Gal-1 ($IC_{50} = 6771 \mu\text{mol l}^{-1}$). Jeho afinita nebyla oproti standardnímu ligandu LacNAc typ 2 lepší, ale díky vyšší jeho selektivitě je perspektivním ligandem při cílené inhibici na Gal-3. *p*NP-LacNAc typ 1 jeví stejné inhibiční vlastnosti vůči Gal-3 jako analog LacNAc typ 2 (IC_{50} (LacNAc typ 1) = $34 \mu\text{mol/l}$; IC_{50} (LacNAc typ 2) = $32 \mu\text{mol/l}$). Pro Gal-1 byl 3× horším inhibítorem než LacNAc typ 2. Zdá se tedy, že vazba $\beta(1\rightarrow3)$ zvyšuje selektivitu tohoto typu disacharidů vůči Gal-3 v porovnání s Gal-1. Produkt *p*NP-LacNAc typ 1 je o to atraktivnější, že tato látka je na trhu poměrně drahá (Carbosynth - 10 mg odpovídá 585 \$) a je z biochemického hlediska zajímavá např. jako standardní substrát pro lakto-*N*-biosidasy (EC 3.2.1.140) [88]. Přítomnost *p*-nitrofenylu na C-1 neměla v tomto případě zásadní vliv na afinitu ke galektinu, i když přítomnost aromatické skupiny v blízkosti C-1 může do jisté míry nespecificky podpořit vazbu ligandu do vazebného místa galektinu [22].

6. Závěr

V rámci teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o glykosidasách, dosavadní poznatky o galektinech, jejich sacharidových ligandech a způsobu stanovení interakce galektin-ligand.

V experimentální části byla purifikována β -galaktosidasa o výtěžku 22 mg protein na 1 g buněk o specifické aktivitě 1,2 U/mg. Enzym byl následně biochemicky charakterizován a využit pro enzymové syntézy.

Byla provedena série analytických transglykosylačních reakcí za účelem zjištění vhodných podmínek pro syntézu dvou vybraných strukturně odlišných disacharidů: TF antigen (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc) a *p*NP-LacNAc typ 1 (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow O)-*p*NP). Následně byly provedeny syntézy těchto látek v semi-preparativním měřítku a jejich strukturní charakterizace: TF antigen (10 mg, 92 % čistota) a LacNAc typ 1 (8 mg, 97 % čistota)

U jednotlivých produktů byla změřena vazebná afinita ke galektinům Gal-1 a Gal-3. TF antigen se ukázal 25 \times selektivnější ke Gal-3. Pro Gal-3 bylo zjištěno $IC_{50} = 267 \pm 59 \mu\text{mol/l}$ a pro Gal-1 $IC_{50} = 6771 \pm 206 \mu\text{mol/l}$. *p*NP-LacNAc typ 1 jevil srovnatelné inhibiční vlastnosti pro Gal-3 jako analog LacNAc typ 2 s β (1-4) vazbou ($IC_{50} = 34 \pm 4 \mu\text{mol/l}$). Afinita ke Gal-1 byla trojnásobně horší, než má zmíněný analog s výsledným $IC_{50} = 148 \pm 22 \mu\text{mol/l}$. Připravené látky jsou zajímavé i s komerčního hlediska, vzhledem k cenám těchto produktů na trhu.

7. Zdroje

- [1] P. Fialová a V. Křen, „Enzymatic approaches to O-glycoside introduction: Glycosidases“, *Comprehensive Glycoscience*, 453-487 (2007)
- [2] P.M. Danby a S.G. Withers, „Advances in enzymatic glycoside synthesis“, *ACS Chem. Biol.* **11**:7, 1784-1794 (2016)
- [3] P.M. Coutinho, B. Henrissat, 1999, Carbohydrate-Active Enzymes server at URL:<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- [4] K. Ajisaka, H. Nishida, H. Fujimoto, „Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of β -galactosidase“, *Biotechnology Letters* **9**, 243–248 (1987)
- [5] E. Rajnochová, J. Dvořáková, Z. Huňková, V. Křen, „Reverse hydrolysis catalysed by β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*“, *Biotechnology Letters* **19**, 869–872 (1997)
- [6] G. Vic, D. Thomas, D.H.G. Crout, „Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl β -D-glucopyranosides“, *Enzyme and Microbial Technology* **20**:8, 597–603 (1997)
- [7] E. Johansson, L. Hedbys, K. Mosbach, P.-O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson, „Studies of the reversed α -mannosidase reaction in high concentrations of mannose“, *Enzyme and Microbial Technology* **11**:6, 347–352 (1989)
- [8] V. Křen, E. Rajnochová, Z. Huňková, J. Dvořáková, P. Sedmera, „Unusual nonreducing sugar GlcNAc β (1 \rightarrow 1)Man β formation by β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*“, *Tetrahedron Letters* **39**:52, 9777–9780 (1998)
- [9] C. Garcia-Oliva, P. Hoyos, L. Petrásková, N. Kulik, H. Pelentová, A. H. Cabanillas, Á. Rumbero, V. Křen, M. J. Hernáiz, P. Bojarová, „Acceptor specificity of β -N-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus*: A rational explanation“, *Int. J. Mol. Sci.* **20**:24, 6181-6198 (2019)
- [10] L. Weignerová, E. Rajnochová-Herkommerová a V. Křen, „Enzymová reverzní glykosylace“, *Chemické listy* **93**, 781-787 (1999)
- [11] K. Ishikawa, M. Kataoka, T. Yanamoto, M. Nakabyashi, M. Watanabe, S. Ishihara a S. Yamaguchi, „Crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the construction of the thermophilic mutants“, *FEBS J.* **282**:13, 2540-2552 (2015)
- [12] K. Wallenfels a R. Wei, „ β -Galactosidase“, *The Enzymes* **7**, 617-663 (1972)
- [13] J. Song, K. Abe, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, S. Yamaguchi et al., „Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*“, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:2, 268–278, (2011)
- [14] Ch. Fischer a T. Kleinschmidt, „Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: a review“, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 678-697 (2018)
- [15] T.V. Vuong a D.B. Wilson. „Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity“, *Biotechnol and Bioeng* **107**, 195-205 (2010)

- [16] N.F. Brás, P.A. Fernandes a M.J. Ramos, „QM/MM Studies on the β -Galactosidase catalytic mechanism: hydrolysis and transglycosylation reactions“, *J. Chem. Theory Comput* **6**:2, 421-433 (2010)
- [17] P. Bojarová a V. Křen, „Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives“, *Biomater. Sci.* **4**:8, 1142-1160 (2016)
- [18] L. Johannes, R. Jacob a H. Leffler, „Galectins at a glance“, *J. Cell. Sci.* **131**:9, (2018)
- [19] J. Hirabayashi a K.-I. Kasai, „The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution“, *Glycobiology* **3**:4, 297-304 (1993)
- [20] S. H. Barondes et al., „Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins“, *Cell* **76**:4, 597-598 (1994)
- [21] S. Morris, N. Ahmad, S. André, H. Kaltner, „Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7.“, *Glycobiology* **14**:3, 293-300 (2004)
- [22] D. Laaf, P. Bojarová, L. Elling, V. Křen, „Galectin-carbohydrate interactions in biomedicine and biotechnology“, *Trends Biotechnol.* **37**:4, 402-415 (2018)
- [23] S. Di Lella, V. Soundblad, J.P. Celiani, C.M. Guardia, D.A. Estrin, G.R. Vasta a G.A. Rabinovich, „When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again“, *Biochemistry* **50**:37, 7842-7857 (2011)
- [24] H. Blanchard, K. Bum-Erdene a M.W. Hugo, „Inhibitors of galectins and implications for structure-based design of galectin-specific therapeutics“, *Austral. J. Chem.* **67**:12, 1763-1779 (2014)
- [25] Y. D Lobsanov, M. A Gitt, H. LefflerBarondes, S. H. a J. M.Rini, „X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution“, *J. Biol. Chem.* **268**:36, 27034-27038 (1993)
- [26] C. Diehl, O. Engstrom, T. Delaine, M. Hakansson, S. Genheden, K. Modig, Leffler, U. Ryde, U. J. Nilsson a M. Akke, „Protein flexibility and conformational entropy in ligand design targeting the carbohydrate recognition domain of galectin-3“, *J. Am. Chem. Soc* **132**:41, 14577-14589 (2010)
- [27] H. Ideo, T. Matsuzaka, T. Nonaka, A. Seko a K. Yamashita, „Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans“, *J. Biol. Chem.* **286**:13, 11346-11355
- [28] D.N. Cooper, S.M. Massa, S.H. Barondes, „Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin“, *J. Cell. Biol.* **115**:5, 1437-1448 (1991)
- [29] R. Thijssen, E. Slinger, K. Weller, C.R. Geest, T. Beaumont, M.H.J. van Oers, A.P. Kater a E. Eldering, „Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors“, *Haematologica* **100**:8, 302-306 (2015)
- [30] I. Camby, M.L. Mercier, F. Leranc and R. Kiss, „Galectin-1: a small protein with major functions“, *Glycobiology* **16**:11, 137-157 (2006)
- [31] D.N. Cooper, S.M. Massa, S.H. Barondes, „Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin“, *J. Cell. Bio.* **115**:5, 1437-1448 (1991)
- [32] Z. Qun, R.D. Cummings, „L-14 Lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion“, *Arch. Biochem. Biophys.* **300**:1, 6-17 (1993)

- [33] D.M. Skrincosky, H.J. Allen, R.J. Bernacki, „Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins.“, *Cancer Res.* **53**:11, 1 2667-2675 (1993)
- [34] N.K. Mahanthappa, D.N. Cooper, S.H. Barondes, G.A. Schwarting, „Rat olfactory neurons can utilize the endogenous lectin, L-14, in a novel adhesion mechanism.“, *Development* **120**:6, 1373-1384 (1994)
- [35] A. Paz, R. Haklaim, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, Y. Kloog, „Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation“, *Oncogene* **20**:51, 7486-7493 (2001)
- [36] K. Wdowiak, T. Francuz, E. Gallego-Colon, N. Ruiz-Angamez, M. Kubeczko, I. Grochola aj. Wojnar, „Galectin targeted therapy in onkology: Current knowledge and perspectives“, *Int. J. Mol.* **19**:1, 210 (2018)
- [37] J. Gamrekelashvili, C. Krüger, R. von Wasielewski, M. Hoffmann, K.M. Huster, D.H. Busch, P.M. Manns, F. Korangy, T.F. Greten, „Necrotic tumor cell death *in vivo* impairs tumor-specific immune response“, *J. Immunol.* **178**:3, 1573-1580 (2007)
- [38] X.-Y. Zhao, T.-T. Chen, L. Xia, M. Guo, Y.Xu, F.Yue, Y.Jiang, G.-Q. Chen, K.-W. Zhao, „Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells“, *Carcinogenesis* **31**:8, 1367-1375 (2010)
- [39] Y. Harazono, K.Nakajima, A. Raz, „Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: A solution.“, *Cancer Metastasis Rev.* **33**:1, 285-294 (2014)
- [40] H. Leffler, S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, F. Poirier, „Introduction to galectins“, *Glycoconjugate J.* **19**, 433-440 (2002)
- [41] R.P. Menon, R.C. Hughes, „Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex“, *Eur. J. Biochem.* **264**:2, 569-576 (1999)
- [42] A.U. Newlaczyl, L. Yu, „Galectin-3 – A jack-of-all-trades- in cancer“, *Cancer Lett.* **313**: 2 , 123-128 (2011)
- [43] V.L. Thijssen, R. Heusschen, J. Caers, A.W. Griffioen, „Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review“, *Biochim. Biophys. Acta* **1855**:2, 235-247 (2015)
- [44] A. Bartolazzi, F. Orlandi, E. Saggiorato, M. Volante, F. Arecco, R. Rossetto, N. Palestini, E. Ghigo, M. Papotti, G. Bussolati, „Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology“, *Lancet Oncol.* **9**:6, 543-549 (2008)
- [45] H.-M. Lin, R.G. Pestell, A. Raz, H.-R.C. Kim, „Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter aktivty throught SP1 and cAMP-responsive element in human breast epithelial cells“, *Oncogene* **21**:52, 8001-8010 (2002)
- [46] G. P. Rédei, „Enycklopedia of genetics, proteomics, and informatics 3rd edition“, Springer 2008,
- [47] N. Zamzami, C. Brenner, I. Marzo, S.A. Susin, G. Kroemer, „Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins“, *Oncogene* **16**:17, 2265-2282 (1998)
- [48] P.B. Rahl, R.A. Young, „MYC and transcription elongation“, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **4**:1, (2014)

- [49] J. Xue, X. Gao, C. Fu, Z. Cong, H. Jiang, W. Wang, T. Chen, Q. Wei, C. Qin, „Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45“, *FEBS Lett.* **587**:24, 3986-3994 (2013)
- [50] S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, „Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands“, *Chem. Rev.* **115**:1, 525-561 (2015)
- [51] I. Fonseca, J. Costa Roca, A. Félix, M.H. Therkildsen, U. Mandel, J. Soares, „Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, Tn and sialosyl-Tn) in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands“, *Histopathology* **25**:6, 537-43 (1994)
- [52] G.F. Springer, P.R. Desai, M. Ghazizadeh a H. Tegtmeier, „T/Tn pancarcinoma autoantigens: fundamental, diagnostic, and prognostic aspects“, *Cancer Detect Prev.* **19**:2, 173–182 (1995)
- [53] T. Janssen, M. Petein, R. Van Velthoven, P. Van Leer, M. Fourmarier, J.P. Vanegas, A. Danguy, C. Schulman, J.L. Pasteels a R. Kiss, „Differential histochemical peanut agglutinin stain in benign and malignant human prostate tumors: relationship with prostatic-specific antigen immunostain and nuclear DNA content“, *Hum. Pathol.* **27**:12, 1341–1347 (1996)
- [54] V.V. Glinsky, M.E. Huflejt, G.V. Glinsky, S.L Deutscher a T.P. Quinn, „ Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on β -galactosidemediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells“, *Cancer Res.* **60**:10, 2584–2588 (2000)
- [55] V. V. Glinsky, G. V. Glinsky, K. Rittenhouse-Olson, M. E. Huflejt, O. V. Glinski, S. L. Deutcher a T. P. Quinn, „The Role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium“, *Cancer Res.* **61**:12, 4851-4857 (2001)
- [56] J. Holgersson. J. Löfling, „Glycosyltransferases involved in type 1 chain and lewis antigen biosynthesis exhibit glycan and core chain specificity“, *Glycobiology* **16**:7, 584–593 (2006)
- [57] C.L. Kerr, W.F.Hanna,J.H. Shaper,W.W. Wright, „Lewis X-containing glycans are specific and potent competitive inhibitors of the binding of zp3 to complementary sites on capacitated, acrosome-intact mouse sperm“, *Biology of Reproduction* **71**:3, 770–777 (2004)
- [58] E. Mitchell,C. Houles,D. Sudakevitz, M. Wimmerova, C. Gautier, S. Perez, A.M. Wu, N. Gilboa-Garber, A. Imberty, „Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of pseudomonas aeruginosa in the lungs of cystic fibrosis patients“, *Natural Sctruct. Biol.* **9**, 918–921 (2002)
- [59] L. Bode, „Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama“, *Glycobiology* **22**:9, 1147-1162 (2012)
- [60] E. Gong, S. Hirohashi, Y. Shimosato, M. Watanabe, Y. Ino, S. Teshima, S. Kodaira, „Expression of carbohydrate antigen 19–9 and stage-specific embryonic antigen 1 in nontumorous and tumorous epithelia of the human colon and rectum“, *J. Natl. Cancer Inst.* **75**:3, 447-454 (1985)
- [61] D.E. Pettijohn, O. Pfenninger, J. Brown, R. Duke, L. Olsson, „Tumorigenic human squamous lung cancer cells have defined cell surface carbohydrates that are absent from nontumorigenic cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3, 802–806 (1988)
- [62] M. Thurin, T. Kieber-Emmons, „ Sa-lea and tumor metastasis: The old prediction and recent findings“, *Hybrid Hybridomics* **21**:2, 111–116 (2002)

- [63] M. Fukuda, „Cell surface glycoconjugates as onco-differentiation markers in hematopoietic cells.“, *Biochim. Biophys. Acta.* **780:2**, 119-150 (1985)
- [64] T. Feize, H.C. Gooi, R.A. Childs, J.K. Pickard, K. Uemura, L.M. Loomes, S.J. Thorpe a E.F. Hounsell, *Biochem. SOC. Trans.* **12**, 591 (1984)
- [65] T. K. van den Berg, H. Honing, N. Franke, A van Remoortere, W. E. C. M. Schiphorst, F.-T. Liu, A. M. Deelder, R. D. Cummings, C. H. Hokke a I. van Die, „LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition“, *J. Immunol.* **173:3**, 1902-1907 (2004)
- [66] A.K. Nyame, A. M. Leppanen, B. J. Bogitsh, a R. D. Cummings. „Antibody responses to the fucosylated LacdiNAc glycan antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice and expression of the glycan among schistosomes“, *Exp. Parasitol* **96:4**, 202-212 (2000)
- [67] A. van Remoortere, G. J. van Dam, C. H. Hokke, D. H. van den Eijnden, I. van Die, a A. M. Deelder, „Profiles of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of *Schistosoma* infected individuals determined by surface plasmon resonance“, *Infect. Immun.* **69:4**, 2396-2401 (2001)
- [68] M. Eberl, J. A. M. Langermans, R. A. Vervenne, K. A. Nyame, R. D. Cummings, A. W. Thomas, P. S. Coulson, a R. A. Wilson, „Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive?“, *J. Infect. Dis.* **183:8**, 1238-1247 (2001)
- [69] R. M. Lequin, „Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)“, *Clinical Chemistry* **51:12**, 2415-2418 (2005)
- [70] S. Avrameas, J. Uriel, „Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion“, *C. R. Acad. Sci.* **262**, 2543-2545 (1966)
- [71] S. Avrameas, „Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde“, *Immunochemistry* **6: 1**, 43-52 (1969)
- [72] Bio-Rad [online], ELISA: Types of ELISA, © 2020 Bio-Rad Laboratories, Inc., [cit. 28.3.2020], dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>
- [73] MyAssays [online], Four Parameter Logistic Regression, © 2020 MyAssays, [cit. 9.5.2020], dostupné z: <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-regression.html>
- [74] GE Life Sciences [online], Surface plasmon resonance, © 2020 General Electric, [cit. 29.3.2020], dostupné z: <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/surface-plasmon-resonance/surface-plasmon-resonance>
- [75] SPR-Pages [online], Kinetic models, © sprpages, [cit. 9.5.2020], dostupné z: <https://www.sprpages.nl/data-fitting/models>
- [76] J. C. Martinez, J. Murciano-Calles, E. S. Cobos, M. Iglesias-Bexiga, I. Luque and J. Ruiz-Sanz. „Isothermal titration calorimetry: thermodynamic analysis of the binding thermograms of molecular recognition events by using equilibrium models“, © 2020 IntechOpen [cit. 29.3.2020], Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/applications-of-calorimetry-in-a-wide-context-differential-scanning-calorimetry-isothermal-titration-calorimetry-and->

- microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry-thermodynamic-analysis-of-the-binding-thermograms-of-molecular-reco
- [77] Malvern Panalytical a Spectris Company [online], Isothermal Titration Calorimetry, © 2020 - Malvern Panalytical Ltd is a Spectris company [cit. 31.3.2020], dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry>
- [78] M. L. Bianconi, „Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions“, *Biophysical Chemistry* **126**:1-3, 59-64 (2007)
- [79] M.A. O'Neill, A. Beezer, J. Mitchell, J. Orchard a J. Connor, „Determination of Michaelis–Menten parameters obtained from isothermal flow calorimetric data“, *Thermochimica Acta* **417**:2, 187-192 (2004)
- [80] Online Microbiology Notes [online], „Thin Layer Chromatography“, © 2020 Online Microbiology Notes [cit. 19.5.2020], dostupné z: <https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/>
- [81] Web o chemii, elektronice a programování, „NMR – nukleární magnetická rezonance“, © 2020 Web o chemii, elektronice a programování [cit. 19.5.2020], dostupné z: <http://z-moravec.net/chemie/fyzikalne-chemicke-metody/nmr-nuklearni-magneticka-rezonance/>
- [82] M.R. Tavares, M. Bláhová, L. Sedláková, L. Elling, H. Pelantová, R. Konefal, T. Etrych, V. Křen, P. Bojarová, P. Chytil, „High-affinity *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers with tailored *N*-acetyllactosamine presentation discriminate between galectins“, *Biomacromolecules*, **21**:2, 641-652 (2020)
- [83] L. Bumba, D. Laaf, V. Spiwok, L. Elling, V. Křen a P. Bojarová, „Poly-*N*-Acetyllactosamine neo-glycoproteins as nanomolar ligands of human galectin-3: binding kinetics and modeling“, *Int. J. Mol. Sci.* **19**:2, 372 (2018)
- [84] P. Bojarová, N. Kulik, K. Slámová, M. Hubálek, M. Kotik, J. Cvačka, H. Pelantová a V. Křen, „Selective β -*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus versicolor*—a tool for producing bioactive carbohydrates“, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**:4, 1737-1753 (2019)
- [85] P. Fialová, L. Weignerová, J. Rauvolfová, V. Přikrylová, A. Pišvejcová, R. Ettrich, M. Kuzma, P. Sedmera a V. Křen, „Hydrolytic and transglycosylation reactions of *N*-acyl modified substrates catalysed by β -*N*-acetylhexosaminidases“, *Tetrahedron* **60**:3, 693-701 (2004)
- [86] P. Bojarová, N. Kulik, M. Hovorková, K. Slámová, H. Pelantová a V. Křen, „The β -*N*-Acetylhexosaminidase in the synthesis of bioactive glycans: protein and reaction engineering“, *Molecules* **24**:3, 599 (2019)
- [87] H. Fujimoto, M. Miyasato, Y. Ito, T. Sasaki a K. Ajisaka, „Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*“, *Glycoconjugate J.* **15**, 155-160 (1998)
- [88] J. Wada, T. Ando, M. Kiyohara, H. Ashida, M. Kitaoka, M. Yamaguchi, H. Kumagai, T. Katayama, K. Yamamoto, „*Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure“, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:13, 3996-4004 (2008)

Příloha 1

¹H a ¹³C NMR data Gal-beta-1,3-GalNAc (600.23 MHz pro ¹H, 150.93 MHz pro ¹³C, D₂O, 30 °C)

alfa anomer

	Atom #	δ_c	m.	δ_H	n _H	m.	J _{C-H} [Hz]	diagnostika HMBC
GalNAc	1	91.49	d	5.279	1	d	3.8	
	2	49.27	d	4.357	1	dd	11.1, 3.8	
	3	77.34	d	4.088	1	dd	11.1, 3.1	1'
	4	69.00	d	4.302	1	d	3.1	
	5	70.47	d	4.193	1	m		1
	6	61.45	t	3.80 ^H	2	m		
	2-CO	174.93	s	-	0	-		
	Ac	22.33	q	2.088	3	s		
Gal	1'	104.90	d	4.554	1	d	7.8	3
	2'	70.97	d	3.587	1	dd	10.0, 7.8	
	3'	72.87	d	3.683	1	dd	10.0, 3.4	
	4'	68.88	d	3.974	1	d	3.4	
	5'	75.24	d	3.72 ^H	1	m		1'
	6'	61.24	t	3.82 ^H	2	m		

beta anomer

	Atom #	δ_c	m.	δ_H	n _H	m.	J _{C-H} [Hz]	diagnostika HMBC
GalNAc	1	95.46	d	4.757	1	d	8.5	
	2	52.80	d	4.039	1	dd	10.9, 8.5	
	3	80.30	d	3.924	1	dd	10.9, 3.2	1'
	4	68.35	d	4.235	1	d	3.2	
	5	75.11	d	3.767	1	m		1
	6	61.24	t	3.82 ^H	2	m		
	2-CO	175.23	s	-	0	-		
	Ac	22.56	q	2.085	3	s		
Gal	1'	105.07	d	4.498	1	d	7.8	3
	2'	70.91	d	3.587	1	dd	10.0, 7.8	
	3'	72.82	d	3.673	1	dd	10.0, 3.4	
	4'	68.88	d	3.968	1	d	3.4	
	5'	75.26	d	3.72 ^H	1	m		1'
	6'	61.24	t	3.82 ^H	2	m		

^H ... HSQC údaj

přibližný molární poměr $\alpha : \beta = 3 : 2$

Příloha 2

¹H a ¹³C NMR data (600.23 MHz pro ¹H, 150.93 MHz pro ¹³C, D₂O, 30 °C)

	Atom	δ_c	m.	δ_H	n _H	m.	J[Hz]	diagnostika HMBC
pNP	<i>i</i> -	161.93	S	-	0			1
	<i>o</i> -	116.88	D	7.263	1	m		
	<i>m</i> -	126.38	D	8.313	1	m		
	<i>p</i> -	143.02	S	-	0			
GlcNAc^A	1	98.67	D	5.423	1	d	8.5	
	2	54.62	D	4.234	1	dd	10.4, 8.5	
	3	82.12	D	4.010	1	dd	10.4, 8.5	1'
	4	68.70	D	3.741	1	dd	9.9, 8.5	
	5	76.10	D	3.794	1	ddd	9.9, 5.3, 2.2	1
	6	60.77	T	4.025	1	dd	12.4, 2.2	
				3.877	1	dd	12.4, 5.3	
	2-CO	175.21	S	-	0			
	2-Ac	22.43	Q	2.065	3	s		
Gal^B	1'	103.78	D	4.539	1	d	7.7	3
	2'	70.98	D	3.614	1	dd	9.9, 7.7	
	3'	72.80	D	3.710	1	dd	9.9, 3.4	
	4'	68.82	D	3.984	1	d	3.4	
	5'	75.59	D	3.78 ^H	1	m		1'
	6'	61.30	T	3.83 ^H	2	m		

^H ... HSQC údaj